

Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Ana Salomé Gonçalves Monteiro

Alterações da sinalização purinérgica gastrointestinal na Diabetes

Tese de mestrado
Mestrado em Bioquímica em Saúde, Bioquímica Clínica e Metabólica

Setembro de 2015

Orientação científica: Professora Doutora Margarida Duarte-Araújo
Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá

Orientador Institucional: Professor Doutor Rúben Fernandes

Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Ana Salomé Gonçalves Monteiro

Alterações da sinalização purinérgica gastrointestinal na Diabetes

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizado sob a orientação científica da Doutora Margarida Duarte-Araújo (Professora Auxiliar) e do Doutor Paulo Correia-de-Sá (Professor Catedrático) do Instituto de Ciências Biomédica Abel Salazar da Universidade do Porto.

Setembro, 2015

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia (Diretor: Professor Doutor Paulo Correia de Sá) – Centro de Investigação Farmacológica e Inovação Medicamentosa (MedInUP), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), sob a orientação científica da Professora Doutora Margarida Duarte-Araújo e do Professor Doutor Paulo Correia de Sá e orientação institucional do Professor Doutor Rúben Fernandes.

Este trabalho permitiu a elaboração e apresentação das seguintes comunicações científicas sob a forma de painéis:

Título: “Diabetic enteric neuropathy is associated with neuronal loss and reduced facilitation of acetylcholine release by prejunctional adenosine A_{2A} receptors”

Autores: S. Gonçalves-Monteiro, M.T. Magalhães-Cardoso, F. Ferreirinha¹, P. Correia-de-Sá, M. Duarte-Araújo.

Congresso: Encontro Investigação Jovem Da Universidade Do Porto (IJUP), 2015 – Porto, Portugal

Participação: Apresentação de painel

Título: “Loss of adenosine A_{2A} receptor-mediated facilitation of cholinergic myenteric neurotransmission in the ileum of type I diabetic rats”

Autores: S. Gonçalves-Monteiro, M.T. Magalhães-Cardoso, P. Correia-de-Sá, M. Duarte-Araújo.

Congresso: XIV MEETING OF THE PORTUGUESE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 2015, Póvoa do Varzim, Portugal

Participação: Apresentação de painel

Título: “Adenosine A_{2A} receptor-mediated facilitation of myenteric cholinergic neurotransmission is impaired in the ileum of diabetic rats” (resumo publicado na revista científica *Autonomic Neuroscience* 11/2015;192:59)

Autores: S. Gonçalves-Monteiro, M.T. Magalhães-Cardoso, P. Correia-de-Sá, M. Duarte-Araújo

Congresso: International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), 2015 – Stresa, Itália.

Participação: Apresentação de painel

Título: “Diabetic rats lose adenosine A_{2A} receptor-mediated facilitation of ileal myenteric cholinergic neurotransmission”

Autores: Salomé Gonçalves-Monteiro, Maria Teresa Magalhães-Cardoso, Fátima Ferreirinha, Venessa Mendes-Henriques, Paulo Correia-de-Sá, Margarida Duarte-Araújo

Congresso: Congresso Internacional de Saúde Gaia-Porto (II CISGP), 2015 – Porto, Portugal

Participação: Comunicação oral

Colaboração em outros trabalhos:

Título: “Calcium signature of ATP-sensitive PDGFR α positive cultured fibroblast-like cells from the rat small intestine”

Autores: A. Alves-Lação, M. Duarte-Araújo, S. Gonçalves-Monteiro, F. Ferreirinha, M.A. Costa, P. Correia-de-Sá

Congresso: Reunião anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, 2015 – Lisboa, Portugal

Participação: Comunicação oral

Qualquer opinião expressa ao longo deste projeto é da inteira responsabilidade do seu autor.

“A ciência é a forma estatisticamente correta de contar histórias.”

Aos meus pais, à minha irmã, ao meu afilhado e ao meu namorado...

Agradecimentos

Começo por agradecer ao Professor Doutor Paulo Correia de Sá, pela oportunidade de realizar este projeto no seu laboratório, permitindo-me trabalhar com ele e toda a sua magnífica equipa. Foi um verdadeiro supervisor e mentor, partilhando em todos os momentos a sua sabedoria e conhecimento científico.

À Doutora Margarida Duarte Araújo, por me fazer acreditar que era capaz de realizar este projeto. Por toda a ajuda, por todo o apoio, por acreditar sempre no meu trabalho, por ser um exemplo de dedicação e humildade, por ter sempre um minuto para me ouvir e por todos os maravilhosos cafés que partilhamos. Obrigado por ser simplesmente como é.

À Dra. Teresa Cardoso, um obrigado especial, por todo o carinho, por toda a ajuda, por toda a confiança que depositou em mim e por ter acreditado sempre que eu podia fazer mais e melhor. Demonstrou acima de tudo ser um exemplar de esforço e dedicação, com uma palavra amiga para todos que por aqui passam.

À Doutora Fátima Ferreirinha por toda a ajuda e disponibilidade, por todos os sorrisos, por tentar ajudar ultrapassar todas as dificuldades encontradas.

À Dra. Alexandrina Timóteo, por todos os conhecimentos transmitidos, por me ensinar todos os cantos do laboratório e pelos “chocolatinhos” frequentes.

À D. Belmira e à D. Helena um obrigado pela ajuda prestada no laboratório e pela boa disposição diária.

À Aurora por ser um exemplo de dedicação e esforço, e acima de tudo de humildade.

Quero agradecer em especial à Adriana Vinhas, à Mafalda Gonçalves e à Vanessa Mendes, sem elas este trabalho não teria sido a mesma coisa. Obrigado pela ajuda, pelas palavras constantes de apoio, pelas brincadeiras, por todos os almoços e jantares e por todo carinho que me deram.

Não quero deixar de agradecer a todas as outras pessoas do laboratório, que tornam este laboratório tão particular.

Ao Doutor Rúben Fernandes por ter aceitado ser meu orientador interno, pelo professor que foi e por toda a boa disposição.

Quero agradecer a todos os meus amigos que me apoiaram nesta longa etapa, aqueles com quem muitas vezes não consegui estar, nem partilhar o meu tempo mas que apesar de tudo isso nunca deixaram de estar a meu lado.

À Cátia Ribeiro e ao Jorge Ventura porque foram aqueles que me compreenderam sempre

ao longo destes últimos 5 anos.

Quero agradecer a todos os meus colegas de mestrado, por terem tornado estes dois anos tão agradáveis e por toda a entre-ajuda. Em especial um agradecimento para a “Martinha”, a Melissa, a Joana, a Sofia, a Cláudia, a Anita e o Nuno.

À Carla e à Bárbara um obrigado por tudo aquilo que fizeram por mim, por me ouvirem, por me apoiarem, por me aturarem nos dias menos bons e por toda a compreensão ao longo deste último ano.

Ao meu namorado, por simplesmente ser tão magnífico, por estar todos os dias ao meu lado, por partilhar todos os momentos desta longa etapa comigo, por todos os conselhos e por toda a paciência que demonstrou. Haveria muito mais para dizer por tudo aquilo que foi, que é e que será para mim...

À minha irmã e ao meu cunhado um agradecimento especial, porque me apoiaram sempre ao longo destes 5 anos, porque foram bons conselheiros em todas as ocasiões, porque tiveram sempre uma palavra amiga em todos os momentos menos bons. E a cima de tudo porque me deram o melhor sobrinho e afilhado do mundo.

Por último um obrigado aos meus pais, sem eles nada disto teria sido possível, porque eles são sem dúvida o exemplo que quero seguir durante toda a minha vida. Obrigado por todo o apoio, por todo o amor, pelas palavras duras nos momentos certos, pela força nos momentos mais difíceis. Simplesmente obrigado por me darem a melhor família do mundo... Amo-vos

Resumo

A dismotilidade entérica é uma complicação a longo prazo da Diabetes mellitus (DM) que causa desconforto significativo em 76% dos pacientes diabéticos. Sabendo que as purinas estão envolvidas na neuromodulação colinérgica e que no SNC de animais diabéticos foram encontradas alterações na expressão de recetores purinérgicos, decidimos investigar se na dismotilidade diabética a neuromodulação purinérgica se encontra preservada. O modelo animal escolhido de diabetes tipo I resultou da administração de estreptozotocina (STZ, 55 mg/kg, IP) a ratas (Rattus norvegicus, Wistar). Este modelo STZ provou ser adequado para o estudo, apresentando 2 semanas após a indução polidipsia, poliúria, polifagia, hiperglicemia e um atraso da motilidade gastrointestinal. A caracterização morfológica macroscópica dos animais STZ revelou um aumento significativo do cego e do intestino. Funcionalmente, estudos preliminares indicam que as contrações espontâneas do íleo dos animais STZ perdem ritmicidade e apresentam maior amplitude que as dos animais controlo de uma forma insensível à TTX, sugerindo o comprometimento das ICC. Paralelamente, estudos imagiológicos revelaram uma perda neuronal mioentérica, principalmente de neurónios nitrérgicos, sendo os colinérgicos preservados. Contudo, a resposta muscular do íleo de animais diabéticos à acetilcolina (ACh) foi inferior à dos controlos, estando a libertação de ACh modulada pela adenosina modificada. Verificou-se que a inibição promovida pelos recetores A_1 se mantinha, mas que se perdia a facilitação mediada pela ativação de recetores A_{2A} , cuja imunorreatividade também se encontrava diminuída. Curiosamente, apesar do catabolismo do ATP e dos seus metabolitos estar aumentado nos animais STZ, não se verificou um aumento dos níveis extracelulares de adenosina. Nos animais diabéticos a adenosina é rapidamente desaminada e recaptada por transportadores de nucleósidos, com principal relevância para os concentrativos, sendo os equilibrativos responsáveis pelo transporte da adenosina em animais controlo.

Os resultados apresentados nesta tese sugerem que a dismotilidade diabética pode dever-se à perda da atividade nitrérgica, das ICC e da neuromodulação purinérgica mediada por recetores A_{2A} , comprometendo assim a libertação de ACh e consequentemente a motilidade GI.

Palavras-Chave: Diabetes, dismotilidade gastrointestinal, adenosina, ICC, neurónios mioentéricos, NTPDases, transportadores de nucleósidos

Abstract

Enteric dysmotility is a long-term complication of Diabetes mellitus (DM) that causes significant discomfort in 76% of diabetic outpatients. Knowing that purines may be involved in synaptic transmission modifications in the CNS of diabetic rats, we decided to investigate if purinergic dysfunction could also play a role in diabetic dysmotility. The diabetes type 1 animal model was induced by a single administration of streptozotocin (STZ, 55 mg/kg, IP) to rats (*Rattus norvegicus* Wistar). This STZ model has proved adequate for the study, since 2 weeks after induction the animals presented polydipsia, polyuria, polyphagia, hyperglycemia and delayed gastrointestinal motility. The macroscopic morphological characterization of STZ animals showed a significant increase in the cecum and bowel. Functionally, preliminary studies indicate that spontaneous contractions of the ileum of STZ animals lose rhythmicity and have a higher amplitude than those of the controls, insensitive to TTX, suggesting the involvement of ICC. In parallel, imaging studies revealed myenteric neuronal loss, especially from nitrergic neurons, while cholinergic are preserved. However, the ileum muscular response of diabetic rats to acetylcholine (ACh) was lower than that of controls. Furthermore, acetylcholine (ACh) inhibition promoted by A₁ receptors is maintained but A_{2A} mediated facilitation is lost, accompanied by a decrease in A_{2A} immunoreactivity. Interestingly, despite ATP and its metabolites catabolism increase, extracellular levels of adenosine are maintained in STZ animals. In diabetic rats adenosine is rapidly deaminated and uptaken by nucleoside transporters, mainly concentrative, while equilibrative nucleoside transporters are responsible for adenosine transport in control animals.

The results presented in this thesis suggest that diabetic dysmotility may be due to loss of nitrergic neurons, ICC impairment and a decrease of A_{2A} facilitatory neuromodulation action, thus compromising the release of ACh and gastrointestinal motility.

Keywords: Diabetes, gastrointestinal dysmotility, adenosine, ICC, myenteric neurons, NTPDase, nucleoside transporters

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Diabetes mellitus</i>	1
i. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1	1
ii. Diabetes e o sistema gastrointestinal.....	2
iii. Modelos animais de diabetes tipo 1	3
a) Mecanismo de ação do STZ.....	4
iv. Neuromodulação purinérgica e implicações fisiopatológicas da diabetes	5
2. Sistema Nervoso Entérico	6
3. Plexo Mioentérico	7
4. Neurotransmissão entérica	8
i. Células intersticiais de Cajal	9
ii. Neurónios entéricos.....	10
5. Sinalização purinérgica	11
i. Nucleótidos e nucleósidos de adenina.....	11
ii. Enzimas que metabolizam os nucleótidos de adenina	12
iii. Transportadores de adenosina	16
iv. Recetores purinérgicos	18
a) Recetores do subtipo P2.....	19
b) Recetores P1 da Adenosina.....	21
6. Neuromodulação purinérgica no plexo mioentérico do íleo de ratazana e implicações fisiopatológicas.....	22
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina.....	29
2. Avaliação da motilidade gastrointestinal:	29
3. Colheita de tecidos: disseção do íleo de ratazana e isolamento da preparação músculo longitudinal - plexo mioentérico	30
4. Registos miográficos das contrações isométricas	32
i. Tratamento dos dados e análise estatística.....	32
5. Cinéticas do catabolismo extracelular das purinas.....	33
i. Preparação e montagem do plexo mioentérico de ratazana.	33
ii. Protocolo Experimental.....	34

iii. Separação e quantificação dos nucleótidos de adenina e dos seus produtos de catabolismo por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultra-violeta (HPLC-UV)	35
a) Instrumentação	35
b) Processo de separação por HPLC-UV	35
c) Quantificação do ATP e metabolitos	37
iv. Determinação dos tempos de semi-vida	38
v. Determinação da atividade da desidrogenase do lactato (DHL)	38
6. Imunofluorescência	39
i. Fixação dos tecidos	39
ii. Bloqueio e permeabilização	40
iii. Marcação com anticorpos	40
a) Marcação com anticorpos primários	41
b) Marcação com anticorpos secundários	42
iv. Microscopia Confocal	42
7. Libertação de ACh-[³ H]	43
i. Período de Equilíbrio	45
ii. Período de Marcação	45
iii. Período de Lavagem	45
iv. Período de libertação	45
v. Quantificação de ACh-[³ H]	46
vi. Efeito dos fármacos e interações farmacológicas	47
8. Fármacos	47
IV. RESULTADOS	49
1. Validação do modelo STZ em ratas	49
2. Avaliação da motilidade gastrointestinal e caracterização morfológica do íleo	51
3. Avaliação da contração muscular isométrica do íleo de animais controle e diabéticos	54
4. Avaliação da perda neuronal e de ICC em animais diabéticos	61
5. Papel dos recetores A1 e A2A da adenosina sobre a libertação de acetilcolina no plexo mioentérico do íleo de animais controle e diabéticos	63
6. Catabolismo do ATP, AMP, adenosina e INO no ML-PM do íleo de animais controle e diabéticos	66
V. DISCUSSÃO	79
VI. CONCLUSÃO	89

VII. PRESPECTIVAS FUTURAS.....	91
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

Índice de quadros

Quadro 1- Diferentes modelos de diabetes, duração de indução e tecido estudado.....	4
Quadro 2- Ecto-enzimas envolvidas no catabolismo extracelular dos nucleótidos e nucleósidos de adenina.	13
Quadro 3 - Enzimas extracelulares que metabolizam os nucleótidos e nucleósidos de adenina. Substratos, atividade e inibidores. K_i = constante de inibição	15
Quadro 4 - Transportadores de nucleósidos concentrativos (CNT) e equilibrativos (ENT). Distribuição, seletividade para o substrato e inibidores.....	18
Quadro 5 - Perfil farmacológico (agonistas e antagonistas) dos recetores P2X e P2Y.	20
Quadro 6 - Perfil farmacológico (agonistas e antagonistas) dos recetores P1.	21
Quadro 7 - Detalhes dos anticorpos utilizados.	41
Quadro 8 - Detalhes dos anticorpos secundários utilizados.	42

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema representativo do mecanismo de ação intracelular da STZ.....	5
Figura 2 - Organização do Sistema Nervoso Entérico	7
Figura 3 - Ilustração (esquerda) e imagem de imunohistoquímica (direita) dos diferentes componentes do plexo mioentérico;	8
Figura 4 - Representação do sincício constituído pelas células musculares lisas (SMC), Células intersticiais e neurónios mioentéricos.....	9
Figura 5 - Representação esquemática da localização e designação das ICC nas diferentes porções e camadas do trato GI.....	10
Figura 6 - Representação esquemática do catabolismo extracelular do ATP em metabolitos ativos, capazes de ativar recetores purinérgicos: P2X, P2Y e P1	11
Figura 7 - Modelo do fluxo de nucleósidos mediada por Na ⁺ , transportadores de nucleosídeos concentrativos (CNT) e de transportadores equilibrativos (ENT).....	17
Figura 8 - Subtipos de recetores purinérgicos. P2X ionotrópicos sensíveis ao ATP (P2X1-7); P2Y metabotrópicos sensíveis ao ATP e ADP (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) e P1 metabotrópicos sensíveis à adenosina (A1, A2A, A2B, A3).	19
Figura 9 - Cascata purinérgica mioentérica. Enzimas envolvidas no catabolismo extracelular do ATP no plexo mioentérico de íleo de ratazana.	23
Figura 10 - Aspeto da cavidade abdominal de ratazana após laparotomia mediana.....	30
Figura 11 - Preparação músculo longitudinal – plexo mioentérico (ML-PM) de íleo de ratazana.	31
Figura 12 - Registo miográfico da atividade espontânea do íleo de ratazana.	33
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental das cinéticas de ATP, AMP, ADO e INO em preparações de PM-ML.	34
Figura 14 - Cromatogramas de HPLC-UV	36
Figura 15 - Curvas de calibração típicas do ATP, ADP, AMP, HX, INO, ADO, utilizadas na quantificação de ATP	37
Figura 16 - Esquema representativo da transformação de piruvato em lactato.	38
Figura 17 - Bloqueio da ligação inespecífica com o soro normal.	40
Figura 18 - Microscópio confocal Olympus FV 1000 (Olympus, Japão).....	43
Figura 19 - Representação esquemática do protocolo utilizado para a quantificação da acetilcolina tritiada libertada a partir do plexo mioentérico de íleo de ratazana.	44
Figura 20 - Bancada de experiências de libertação de ACh-[3H]:.....	44

Figura 21 - Gráfico representativo da liberação de ACh-[³ H] a partir do plexo mioentérico de íleo de ratazana.....	47
Figura 22 - Representação gráfica do consumo de comida e água de animais CTRL e STZ	50
Figura 23 - Gráficos da evolução do peso e da glicemia em animais CTRL e STZ	51
Figura 24 - Avaliação da motilidade gastrointestinal em animais CTRL e STZ.	52
Figura 25 - Avaliação morfológica da cavidade abdominal de animais CTRL e STZ.	52
Figura 26 - Avaliação do peso do cego e do íleo de animais CTRL vs STZ.....	53
Figura 27 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea.....	54
Figura 28 - Comparação da frequência (A) e amplitude média (B) das contrações espontâneas registadas durante o período de incubação em animais CTRL e STZ.	55
Figura 29 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea obtida a partir de animais CTRL (registo superior) e STZ (registo inferior) antes e após a administração de mibefradil (3 µM).	56
Figura 30 - Comparação da frequência (A), amplitude média (B) e tensão basal (C) das contrações espontâneas, registadas após a aplicação de mibefradil (3 µM), em animais CTRL e STZ.....	57
Figura 31 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea obtida a partir de um animal CTRL (registo superior) e de um animal STZ (registo inferior) antes e após a administração de TTX (1 µM).	58
Figura 32 - Gráficos com a comparação da frequência (A), amplitude média (B) e tensão basal (C) das contrações espontâneas, registadas após a aplicação de TTX 1 µM, entre animais CTRL e STZ	59
Figura 33 - Registo miográfico da contração muscular induzida pela ACh (1 nM – 10 nM, aplicação cumulativa) em animais CTRL (registo superior) e STZ (registo inferior).....	60
Figura 34 - Comparação da amplitude mínima das contrações espontâneas registada após a aplicação de doses cumulativas de ACh (1 nM a 10 mM), entre animais CTRL e STZ,	60
Figura 35 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação dupla de ms PGP (verde) com gt nNOS (vermelho).....	61
Figura 36 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação simples de gpVACHT (vermelho).	62
Figura 37 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação simples de rb ANO-1 (verde).	63

Figura 38 - Liberação de ACh-[3H] do plexo mioentérico de íleo de ratazana de animais CTRL e animais STZ.....	64
Figura 39 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb A1 (verde) com gp VACHT (vermelho),	65
Figura 40 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb A2A (verde) com gp VACHT (vermelho),.....	66
Figura 41 - Cinéticas do catabolismo extracelular do ATP (30 μ M) e da formação dos seus metabolitos (ADP, AMP, adenosina, inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A/C) e em STZ (B/D). Os gráficos C e D representam com maior detalhe o intervalo de tempo dos 0 aos 15 minutos.....	67
Figura 42 - Gráficos das razões da formação de ADP e AMP através das NTPDases. Gráfico da taxa de formação de ADP (atividade da NTPDase 2) (A), e gráfico da taxa de formação de AMP (atividade da NTPDase 2 e 3) (B) a partir do ATP (30 μ M) em animais CTRL e animais STZ.....	68
Figura 43 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb NTPDase 2 (verde) com ms PGP (vermelho),.....	69
Figura 44 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb NTPDase 3 (verde) com ms PGP (vermelho),.....	70
Figura 45 - Cinéticas do catabolismo extracelular do AMP (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (adenosina, inosina e hipoxantina), em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e STZ (B).	71
Figura 46 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratazanas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), no plano muscular. Marcação dupla de rb E-5'-nucleotidase (verde) com ms PGP (vermelho). Escala = 50 μ M. Fibras nervosas (seta amarela).	72
Figura 47 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina), em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e em STZ (B). T $\frac{1}{2}$ = tempo de semi-vida da ADO.	73
Figura 48 - Cinéticas do catabolismo extracelular da INO (30 μ M) e da formação do produto do seu catabolismo (hipoxantina) em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e em STZ (B). T $\frac{1}{2}$ = tempo de semi-vida da INO.....	74

Figura 49 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de EHNA (50 μ M) em animais CTRL (à direita) e STZ (à esquerda).....	75
Figura 50 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de dipiridamol (0.5 μ M) em animais CTRL (A) e STZ (B).....	76
Figura 51 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de NBTI 30 μ M, em animais CTRL (à direita) e em STZ (à esquerda).....	76
Figura 52 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de oubaína (2 mM), em animais STZ.....	77

I. INTRODUÇÃO

1. *Diabetes mellitus*

A *Diabetes mellitus* (DM) é atualmente considerada um grupo de doenças metabólicas que se caracteriza por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Apesar de existirem classificações alternativas, a DM é classicamente dividida em 2 grandes grupos: a DM tipo 1 e a DM tipo 2 (Association, 2015). Na DM tipo 1 causas imunomediadas ou idiopáticas provocam a destruição das células β pancreáticas, levando a uma ausência absoluta de insulina, tornando necessária a sua administração exógena (diabéticos insulino dependentes). A DM tipo 2 está associada a maus hábitos alimentares, sedentarismo e obesidade em indivíduos geneticamente predispostos, tipicamente adultos. Este tipo de DM causa a diminuição progressiva da secreção de insulina com o aumento da resistência à sua ação periférica (Association, 2007, Association, 2015, Yarandi and Srinivasan, 2014).

A DM atinge mais de 382 milhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a cerca de 8,3% da população mundial. Em Portugal, 13% da população (cerca de 1 milhão) entre os 20 e os 79 sofre de DM (Diabetes, 2014). A hiperglicemia crónica que ocorre na DM está associado a danos a longo prazo, com disfunção e falência de vários órgãos como os olhos, rins, sistema nervoso, coração e vasos sanguíneos (Association, 2007).

i. *Diabetes mellitus tipo 1*

A diabetes tipo 1 é uma doença imunomediada que leva a uma deficiência absoluta de insulina. Pode ocorrer em qualquer idade, mas aparece mais frequentemente em crianças e adolescentes. Representa apenas 10 % das pessoas com diabetes e resulta de uma destruição autoimune das células β das ilhotas de *Langerhans* do pâncreas (van Belle *et al.*, 2011). Esta destruição está relacionada com a predisposição genética e fatores ambientais que ainda são mal definidos (Association, 2004, van Belle *et al.*, 2011). Quanto à predisposição genética, um ou mais marcadores da destruição imunitária das células β (como auto-anticorpos para as células das ilhotas ou insulina, anticorpos de ácido glutâmico descarboxilase (GAD65) e auto-anticorpos para as tirosina fosfatases IA-2 e IA-2 β) estão presentes em 85-90% dos indivíduos diabéticos em jejum. Além disso, a doença

tem fortes associações ao sistema HLA (antigénio leucocitário humano), com ligação aos genes DQA e DQB e é influenciada pelos genes DRB. Os alelos HLA-DR/DQ podem tanto predispor como proteger do aparecimento de diabetes (Association, 2004).

Neste tipo de diabetes a taxa de destruição das células β é muito variável, sendo rápida em algumas pessoas (principalmente adolescentes e crianças) e lento em outros (principalmente adultos). Alguns pacientes, especialmente os mais jovens, podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Outros têm pequenas hipoglicemias em jejum que podem transformar-se rapidamente em hiperglicemia e/ou cetoacidose grave na presença de infeção ou de outras formas de stresse. Em outros pacientes, particularmente nos adultos, pode existir uma função “residual” das células β do pâncreas que impede a cetoacidose durante vários anos. Neste último estágio da doença há secreção de pouca ou nenhuma insulina, mantendo o péptido C (péptido que resulta da clivagem da pró-insulina em insulina utilizado para dosear a produção endógena de insulina) em níveis baixos ou indetetáveis no plasma (Association, 2004, Association, 2007, Association, 2015, van Belle *et al.*, 2011, Yarandi and Srinivasan, 2014).

Enquanto a DM tipo 2 aparece maioritariamente em pessoas mais velhas, a DM tipo 1 aparece essencialmente em idades muito jovens, fazendo com que os pacientes vivam mais anos com a doença e suas consequências deletérias. É por este motivo que é de elevado interesse estudar a DM tipo 1, fazendo com que os pacientes possam viver mais anos com maior qualidade de vida.

ii. Diabetes e o sistema gastrointestinal

Os distúrbios gastrointestinais (GI) são comuns na DM, mas durante muito tempo não foram associados a uma das muitas complicações da diabetes. Como consequência da DM podem surgir náuseas, vômitos, dor abdominal, azia, gastroparesia, disfagia, obstipação, diarreia, incontinência fecal, entre outros. Atualmente cerca de 76% dos pacientes com diabetes apresentam um ou mais destes sintomas, causando um impacto muito negativo na sua qualidade de vida (Feldman and Schiller, 1983, Harrington *et al.*, 2010). Estima-se que a prevalência de diarreia em pacientes com diabetes seja de 4 a 22% (Ebert, 2005, Rayner *et al.*, 2001). No entanto a obstipação pode alternar com a diarreia, tendo um estudo populacional revelado que 20-40% dos pacientes com diabetes relataram sintomas de

obstipação com aumento do consumo de laxantes (Shakil *et al.*, 2008). Julga-se que o mecanismo subjacente à maioria destes distúrbios da motilidade se deva essencialmente a alterações no sistema nervoso entérico (SNE) (Bagyanszki and Bodi, 2012, Yarandi and Srinivasan, 2014).

iii. Modelos animais de diabetes tipo 1

Para aprofundar o estudo da DM e sua terapêutica recorre-se a modelos em animais de laboratório. Estes modelos podem resultar de alterações genéticas ou manipulações cirúrgicas, dietéticas ou químicas. Há muitas estirpes de roedores com alterações genéticas conducentes a DM, alterações estas que podem ser espontâneas (estirpes mutantes como os ratos diabéticos não-obesos (NOD) e das ratazanas BB (*biobreeding rat*)) ou provocadas (estirpes de animais transgénicos, Knock-out ou outros) (Akbarzadeh *et al.*, 2007, Gazia MMA, 2012, Ismail ZB, 2009, Joost HG, 2012, Novikova L, 2013). Surgiram também modelos cirúrgicos, que requerem a remoção de 90-95% do pâncreas. Evita-se assim que as ilhotas de *Langerhans* remanescentes hipertrofiem, levando à produção de insulina suficiente para suprir as necessidades metabólicas dos animais. Quanto aos modelos dietéticos, são baseados principalmente em dietas ricas em altos teores de sacarose e de gordura, induzindo um aumento percentual da gordura corporal e uma diminuição da tolerância à glicose juntamente com hiperinsulinemia (Skovso, 2014).

Quanto aos modelos induzidos quimicamente, são muitas vezes os escolhidos por apresentarem uma boa relação início de utilização/custo. Apresentam como vantagem adicional o fato de serem aplicáveis à maioria das espécies de animais de laboratório e de ser fácil comparar com os controlos respetivos (Deeds *et al.*, 2011).

Como se pode ver na Tabela 1 existe uma enorme variedade de modelos que são utilizados para o estudo do trato gastrointestinal, no entanto o tempo após o qual são utilizados é muito variável, dependendo muitas vezes daquilo que se pretende estudar.

Quadro 1- Diferentes modelos de diabetes, duração de indução e tecido estudado

Espécie	Modelo	Duração da indução (semanas)	Tecido estudado
Ratazana	STZ	8	Cólon/Íleo
Rato	OLETF	60	Cólon proximal
Rato	BB	1, 8 e 16	Plexo Mioentérico
Rato C57B1/6	Dieta hipercalórica	8	PM do duodeno
Rato	NOD	1	Duodeno

Fonte: (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007b, Demedts *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2011, Stenkamp-Strahm *et al.*, 2013)

Atualmente o aloxano e a estreptozotocina são os produtos químicos diabetogênicos mais utilizados para induzir modelos animais de DM. São análogos citotóxicos da glicose que atuam nas células β pancreáticas, mas a sua citotoxicidade é conseguida através de vias diferentes (Schein *et al.*, 1974, White, 1963).

Foi em 1963 que Rakieten e colaboradores (Rakieten *et al.*, 1963) relataram a ação diabetogênica da estreptozotocina, causada pela necrose específica das células β do pâncreas. Esta nitrosoamida de ocorrência natural passou então a ser utilizada como agente quimioterápico para o tratamento de neoplasias/metástases pancreáticas e agente indutor de DM em animais de experimentação (Lenzen, 2008, Schein *et al.*, 1974).

a) Mecanismo de ação do STZ

A estreptozotocina (STZ) é uma glucosamina-nitrosureia produzida pelo *Streptomyces achromogenes* que possui no carbono 2 um grupo nitrosoureia. Sendo um análogo da glucose é transportada para o interior das células β pancreáticas através de transportadores de glucose do tipo 2 (GLUT2) (Karunanayake *et al.*, 1976, Lenzen, 2008, Tjalve *et al.*, 1976). Como consequência, outros órgãos que expressam GLUT2 (como o fígado e os rins) vão estar mais suscetíveis à toxicidade indesejável da STZ (Rerup, 1970, Weiss, 1982). No meio intracelular (Figura 1) a STZ desencadeia 5 mecanismos de toxicidade diferentes: 1) Liberação de monóxido de azoto (NO), pois é uma substância dadora desse

composto; 2) Produção de espécies reativas de oxigénio (como aniões superóxido); 3) Alquilação do ADN (ácido desoxirribonucleico) (LeDoux *et al.*, 1986, Lenzen, 2008, Murata *et al.*, 1999, Pieper *et al.*, 1999, Uchigata *et al.*, 1982, Yamamoto *et al.*, 1981); 4) Esgotamento do ATP das células β pancreáticas (Sandler and Swenne, 1983, Uchigata *et al.*, 1982, Yamamoto *et al.*, 1981) e 5) Inibição da enzima N-acetilglucosamina, N-acetil-B- D-glucosamina e glicosilação irreversível de proteína (Konrad and Kudlow, 2002, Lenzen, 2008). Todos estes mecanismos conduzem à necrose das células β do pâncreas, resultando numa deficiência de produção e secreção de insulina (Bennett and Pegg, 1981, Lenzen, 2008, Wilson *et al.*, 1988).

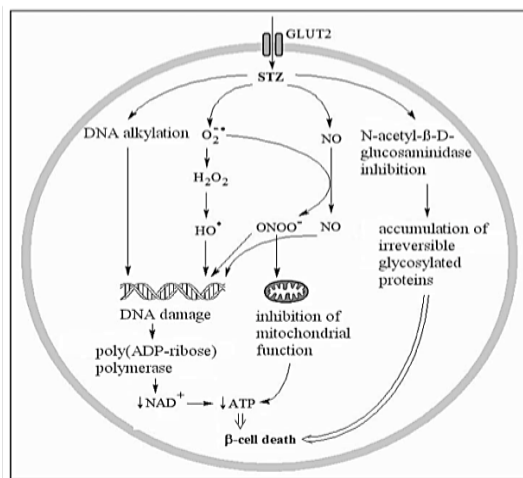


Figura 1 - Esquema representativo do mecanismo de ação intracelular da STZ. Adaptado de (Soltesova D, 2011)

iv. Neuromodulação purinérgica e implicações fisiopatológicas da diabetes

A neuropatia diabética é a complicação mais comum da DM, que de acordo com agência americana *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney - National Institute of Health* (NIDDK-NIH) afeta cerca de 60 a 70% dos diabéticos, causando elevada morbidade e mortalidade. Apresenta-se principalmente sob a forma de polineuropatia sensitivo-motora simétrica (causando dor, formigues ou perda de sensibilidade principalmente nas mãos, braços, pés e pernas) ou neuropatia autonómica, afetando a inervação cardiovascular, respiratória, ocular, genitourinária e digestiva.

Considerando a fisiopatologia descrita, atribuiu-se à neuropatia autonómica as manifestações GI da diabetes. Contudo, evidências recentes sugerem que as alterações

independentes do sistema nervoso autónomo (SNA) que se observaram no sistema nervoso entérico (SNE), células intersticiais de Cajal (ICC) e as fibras musculares lisas (miopatia) de animais diabéticos podem ter outras causas (Anitha *et al.*, 2006, Nezami and Srinivasan, 2010, Ordog, 2008). Recorrendo principalmente a modelos animais de roedores com DM tipo 1 induzida pela administração de STZ, observou-se a diminuição do número dos neurónios entéricos e a redução do tamanho das fibras nervosas, axónios e bainhas de mielina, assim como uma diminuição da velocidade de condução nervosa (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007b, Yarandi and Srinivasan, 2014). Contudo, apesar da diminuição do número de neurónios entéricos relatado (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007a), estudos controversos referem o aumento do número de neurónios colinérgicos e contendo neuropéptido Y, galanina ou serotonina (Belai *et al.*, 1988). Estes autores (Belai *et al.*, 1988, Chandrasekharan and Srinivasan, 2007b, Yarandi and Srinivasan, 2014) indicam também a redução de neurónios nitrérgicos e outros que libertam neuropéptidos, como a substância P (SP), o péptido intestinal vasoativo (VIP) ou péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP).

A apoptose neuronal parece contribuir para a neurodegeneração observada em modelos animais com neuropatia diabética e em culturas celulares de animais diabéticos, mas a glicotoxicidade pode também estar implicada. Níveis elevados de glicose resultam na despolarização de neurónios entéricos com consequente aumento do cálcio intracelular. Contudo, não se devem negligenciar outros fatores que podem estar implicados na fisiopatologia das complicações diabéticas no sistema nervoso entérico (SNE), como as alterações na sinalização da insulina e a diminuição dos fatores neurotróficos. O tratamento atempado com insulina parece prevenir alterações da motilidade intestinal e a perda de neurónios nitrérgicos no íleo e no cólon de ratos diabéticos (induzidos com STZ) (Nezami and Srinivasan, 2010).

2. Sistema Nervoso Entérico

O trato gastrointestinal tem um sistema nervoso intrínseco, o sistema nervoso entérico. O SNE é o principal responsável pelo processo de digestão, absorção de nutrientes, secreção / reabsorção de fluidos e motilidade no aparelho digestivo (Gwynne and Bornstein, 2007). Este sistema tem vindo a ser amplamente estudado ao longo dos últimos anos, e hoje em

dia sabe-se que é composto por cerca de 500 milhões de neurónios organizados em milhares de pequenos gânglios que se ligam entre si através de fibras nervosas, formando redes neuronais designadas por plexos nervosos (Figura 2) (Furness, 2006, Gershon, 1999).

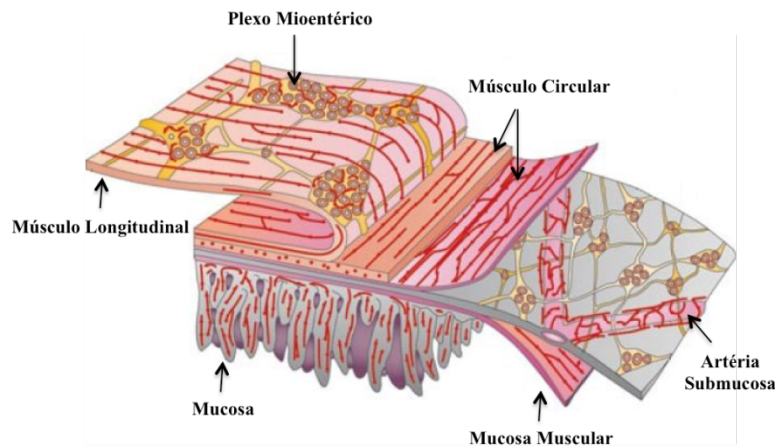


Figura 2 - Organização do Sistema Nervoso Entérico (Furness, 2006).

Os principais plexos nervosos existentes no SNE são o plexo mioentérico (ou de Auerbach) - que se localiza entre o músculo longitudinal e circular (Figura 2) e o plexo submucoso (ou de Meissner) - presente entre o músculo circular e a mucosa (Figura 2) (Furness, 2006).

3. Plexo Mioentérico

O Plexo Mioentérico (PM) é um componente do SNE que regula a atividade contrátil do aparelho digestivo. Este encontra-se entre as duas camadas musculares desde o esófago superior até ao esfíncter anal interno. O PM é composto por três redes (Figura 3) com fibras de diferentes espessuras; a rede primária, que é constituída pelos gânglios que contêm os corpos celulares dos neurónios mioentéricos e pelas conexões interganglionares. A rede secundária é constituída por longos filamentos nervosos paralelos ao sentido das fibras musculares circulares e a rede terciária, composta essencialmente por filamentos nervosos mais finos, que formam uma malha que ocupa o espaço existente entre as fibras mais espessas das restantes redes (Belai *et al.*, 1988, Brookes, 2006, Furness, 2006)

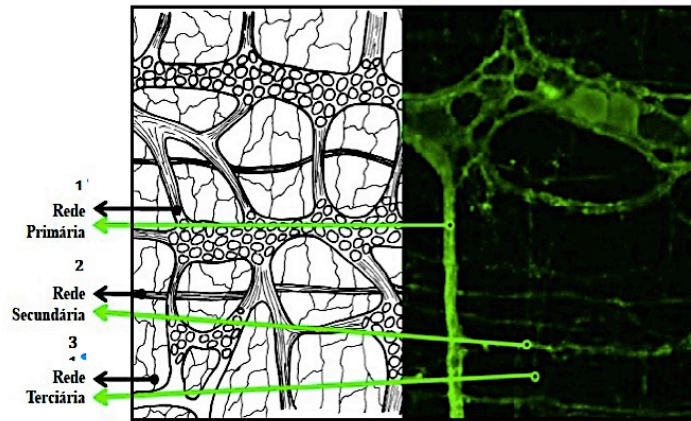


Figura 3 - Ilustração (esquerda) e imagem de imunohistoquímica (direita) dos diferentes componentes do plexo mioentérico; 1- Rede Primária; 2- Rede Secundária e 3- Rede Terciária (Imagem gentilmente cedida por Duarte-Araújo).

4. Neurotransmissão entérica

Classicamente a junção mioentérica é constituída por terminais nervosos em contacto próximo com as células musculares lisas (SMC), que respondem à libertação neuronal de neurotransmissores e neuromoduladores. Mas esta arquitetura sofreu recentemente uma remodelação, com a inclusão de novos intervenientes que vieram alterar o conceito da junção mioentérica – as células intersticiais. Estas células estabelecem relações muito próximas tanto com os terminais nervosos como com as células musculares lisas, formando um sincício (Figura 4). Neste sincício as células encontram-se associadas eletricamente através de junções estreitadas, mantendo um contacto tão próximo que pode ser inferior a 20 nm como já se demonstrou em estudos ultra-estruturais (Horiguchi *et al.*, 2003, Ward *et al.*, 1999, Yamamoto, 1977). Pensando no conceito de sinapse tripartida, são as células intersticiais que assumem o papel de geradoras de ritmicidade elétrica, às quais se atribui a capacidade de coordenar a propagação e a integração de estímulos (Sanders *et al.*, 2014).

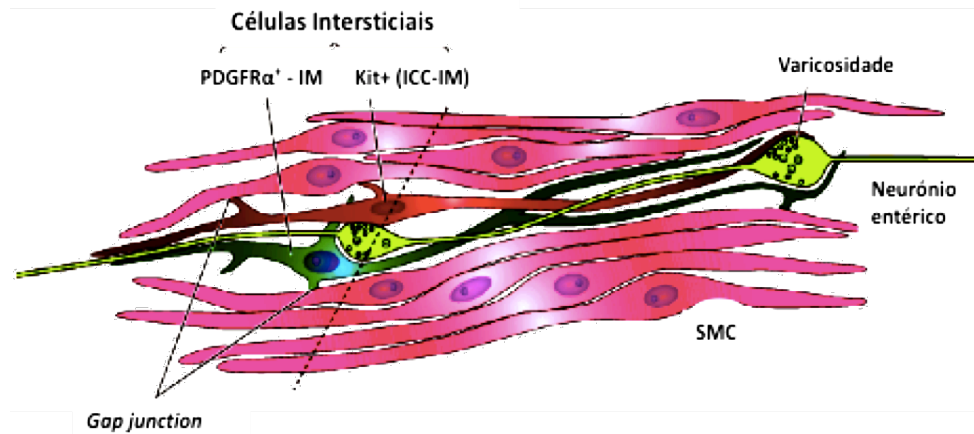


Figura 4 - Representação do sincício constituido pelas células musculares lisas (SMC), células intersticiais e neurônios mioentéricos. Adaptada de (Hanani *et al.*, 2005).

i. Células intersticiais de Cajal

De entre as células intersticiais (PDGFR α positivas ou c-Kit positivas), as células intersticiais de Cajal (ICC, c-Kit positivas) são as que se encontram mais bem descritas, sendo consideradas como as células “marca-passos” do aparelho GI. As ICC são responsáveis pela geração e coordenação da propagação das ondas lentas pelas camadas musculares, pela mediação da neurotransmissão proveniente do SNE e ainda pela deteção de eventos mecânicos (como o estiramento) coordenando as respetivas respostas (Al-Shboul, 2013, Epperson *et al.*, 2000, Huizinga *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2010).

Com base na sua localização anômica (Figura 5), têm vindo a ser descritos vários tipos de ICC (Al-Shboul, 2013). No trato GI o primeiro grupo de ICC organizado está localizado na subserosa (ICC-SS), sendo composto por células estreladas mais ou menos dispersas (Hanani *et al.*, 2005). De seguida, à volta do plexo mioentérico, encontra-se a maior população de ICC, as ICC-MP (Al-Shboul, 2013, Sanders *et al.*, 2006). Estas células de aspeto estrelado têm prolongamentos múltiplos que se interligam formando uma rede à volta do plexo mioentérico, entre as camadas de músculo circular e longitudinal (Al-Shboul, 2013, Lees-Green *et al.*, 2011). O músculo circular contém as ICC-CM, que adquirem uma forma bipolar ou fusiforme orientada de acordo com o eixo maior das células musculares circundantes. No músculo longitudinal encontramos as ICC-LM, que são semelhantes às ICC-CM. Devido à sua semelhança é comum utilizar-se um termo coletivo para as ICC-LM e ICC-CM, as ICC intramusculares (ICC-IM) (Hanani *et al.*,

2005, Al-Shboul, 2013, Diabetes, 2014, Levesque *et al.*, 2007). No intestino delgado ICC formam um plexo particular, o plexo muscular profundo (ICC-DMP), constituído por células fusiformes que se dispõem numa camada fina sobre o músculo circular (Al-Shboul, 2013, Diabetes, 2014, Hanani *et al.*, 2005, Levesque *et al.*, 2007).

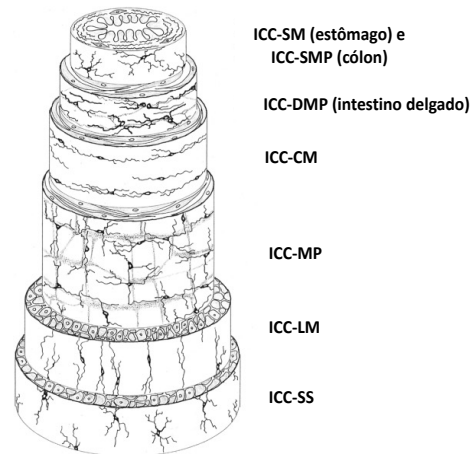


Figura 5 - Representação esquemática da localização e designação das ICC nas diferentes porções e camadas do trato GI. (Adaptada de (Hanani *et al.*, 2005)).

ii. Neurónios entéricos

No SNE existem vários tipos distintos de neurónios, caracterizados pela sua morfologia, propriedades neuroquímicas, fisiologia e funções particulares (Brookes, 2001, Costa *et al.*, 1996, Harrington *et al.*, 2010). Estudos realizados por Costa e colaboradores demonstraram que cerca de 30% dos neurónios entéricos apresentam imunorreactividade para a colina acetiltransferase (ChAT, a enzima responsável pela síntese da acetilcolina) e para a substância P (SP), estando a sua atividade associada à contração do músculo liso intestinal, sendo por isso classificados como neurotransmissores excitatórios. De entre estes a acetilcolina (ACh) é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNE, pois indubitavelmente induz as maiores respostas, sendo responsável pela contração do músculo liso intestinal por via da ativação de recetores muscarínicos, dos subtipos M_2 e M_3 (Costa *et al.*, 2000, Harrington *et al.*, 2010). Estes receptores muscarínicos também estão expressos nos terminais nervosos e podem indiretamente modular as respostas por inibição ou facilitação da transmissão neuronal no SNE (Tobin *et al.*, 2009, Vieira *et al.*, 2009). Quanto aos neurotransmissores inibitórios, o monóxido de azoto (NO), o péptido intestinal

vasoativo (VIP) e a adenosina trifosfato (ATP) estão entre os mais importantes (Ward *et al.*, 2000).

5. Sinalização purinérgica

Após o reconhecimento unânime da ACh como principal neurotransmissor excitatório do SNE na primeira metade do século XX, a identificação dos neurotransmissores inibitórios foi consideravelmente mais difícil e controversa. Foi na década de 70 do mesmo século que o Professor Geoffrey Burnstock conseguiu demonstrar que o ATP - anteriormente considerado apenas uma fonte bioquímica ubíqua de energia - se podia comportar como um neurotransmissor inibitório no aparelho digestivo (Burnstock, 1976, Burnstock *et al.*, 1970). Nessa mesma altura passaram a ser utilizados no meio científico os termos “purinérgico” (relativo aos mecanismos extracelulares mediados pelas purinas) e “transmissão purinérgica” (referindo-se ao papel do ATP como neurotransmissor).

i. Nucleótidos e nucleósidos de adenina

Depois das primeiras descobertas do Professor Burnstock e colaboradores muitas outras se seguiram, sendo hoje em dia o ATP conhecido e estudado pela sua capacidade de se comportar como cotransmissor ou como neuromodulador. O primeiro passo da complexa sinalização purinérgica é a libertação do ATP. Este pode ser libertado por lise celular, por difusão facilitada através de transportadores de nucleótidos, por exocitose vesicular ou por transporte electrodifusional através de canais de libertação específicos (Bours *et al.*, 2006, Yegutkin, 2008). Após a sua libertação, o ATP pode atuar diretamente sobre recetores purinérgicos (dos subtipos P2X e P2Y) ou ser metabolizado dando origem a outros produtos biologicamente ativos: difosfato de adenosina (ADP, capaz de ativar recetores do subtipo P2Y), adenosina monofosfato (AMP) e adenosina (ADO, capaz de ativar recetores do subtipo P1) (Figura 6).



Figura 6 - Representação esquemática do catabolismo extracelular do ATP em metabolitos ativos, capazes de ativar recetores purinérgicos: P2X, P2Y e P1.

Esta metabolização sequencial com produção de metabolitos ativos foi descrita como uma “cascata purinérgica”, capaz de desempenhar importantes funções neuromoduladoras no plexo mioentérico (Duarte-Araujo *et al.*, 2009). Embora o catabolismo extracelular do ATP contribua apenas parcialmente para a concentração total de nucleósidos intersticiais no plexo mioentérico, esta via pode ser relevante em determinadas condições patológicas, quando os níveis de ATP extracelular aumentam consideravelmente (Bogers *et al.*, 2000, Correia-de-Sa *et al.*, 2006, Duarte-Araujo *et al.*, 2009, Marquardt *et al.*, 1984, Mendes *et al.*, 2015, Vieira *et al.*, 2014).

ii. Enzimas que metabolizam os nucleótidos de adenina

Depois de ser libertado para o meio extracelular, o ATP proveniente de neurónios e de células não-neuronais é metabolizado em diferentes nucleótidos e nucleósidos de adenina. Várias famílias de enzimas extracelulares (Quadro 2) estão envolvidas neste catabolismo sequencial, como: as ecto-nucleotídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases); ecto-nucleotídeo pirofosfatase fosfodiasterase (E-NPP); ecto-fosfatases alcalinas (FA); ecto-5'-nucleotidase (E-5' nucleotidase); adenosina desaminase (ADA) e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (Burnstock, 2006, Zimmermann, 2001). Dos 4 primeiros grandes grupos de enzimas é possível fazer uma divisão quanto à sua capacidade de hidrólise, uma vez que as FA e as E-NPP são enzimas capazes de hidrolisar uma grande variedade de substratos para além dos nucleótidos / nucleósidos de adenina. Relativamente ao grupo das E-NTPDases, é uma família dominante de ectonucleotidasas capazes de hidrolisar tri e/ou difosfatos, mas não monofosfatos de adenina. Requerem concentrações milimolar de Ca^{2+} e Mg^{2+} para exercerem a sua atividade máxima (Yegutkin, 2008).

As NTPDases desfosforilam uma variedade de nucleosídeos tri (como o ATP e o UTP) e difosfatados (como o ADP e o UDP) com especificidade de substrato e atividades diferentes. Esta família é constituída por oito subtipos diferentes, diferindo entre si na afinidade que têm sobre o substrato, nas propriedades catalíticas que exibem e na topografia que assumem nas membranas (Kukulski *et al.*, 2005, Robson *et al.*, 2006). Apenas quatro das NTPDases (NTPDases 1, 2, 3 e 8) estão localizadas na superfície das células, com o local catalítico voltado para o exterior, mantendo uma atividade

extracelular. São estas as principais enzimas responsáveis pela hidrólise de trifosfatos e difosfatos de nucleósido sob condições fisiológicas (Cardoso *et al.*, 2015, Zimmermann, 1996).

Quadro 2- Ecto-enzimas envolvidas no catabolismo extracelular dos nucleótidos e nucleósidos de adenina.

FAMÍLIA DAS ECTO-ENZIMAS	Ecto-enzima (nome comum)	Ecto-enzima (nome alternativo)	Reações catalisadas
E-NPP (EC 3.1.4.1)	NPP 1 NPP 2 NPP 3	PC-1 Autotaxina, PD-lalfa B10, PD-lbeta	ATP – AMP ATP – AMP ATP – AMP
E-NTPDases (EC 3.6.1.5)	NTPDase 1 NTPDase 2 NTPDase 3 NTPDase 8	Ecto-apirase, CD39 Ecto-ATPase, CD39L1 HB6m CD39L3, hATPDase	ATP – AMP / ADP -AMP ATP – ADP ATP – ADP – AMP ATP – ADP – AMP
FA (EC 3.1.3.1)	Fosfatases alcalinas	-	ATP – ADP – AMP -- ADO
E-5tidase (EC 3.1.3.5)	E-5'-Nucleotidase	CD73	AMP – ADO

Fontes: (Burnstock, 2006, Cardoso *et al.*, 2015, Yegutkin, 2008, Zimmermann, 2000)

No Quadro 3 estão representadas as diferentes E-NTPDases com os respetivos substratos, atividade e inibidores. A NTPDase 1 tem a particularidade de desfosforilar ATP diretamente em AMP, formando-se muito pouco ADP. O ADP formado é também metabolizado em AMP pela mesma enzima (Baqi *et al.*, 2009, Cardoso *et al.*, 2015, Knowles and Li, 2006, Levesque *et al.*, 2007). Quanto à NTPDase 2, hidrolisa preferencialmente o ATP (10 ATP:1 ADP) permitindo a acumulação extracelular de ADP, facilitando a ativação de recetores sensíveis a esse nucleótido (Duarte-Araujo *et al.*, 2009, Matsuoka and Ohkubo, 2004). A NTPDase 3 é principalmente responsável pelo catabolismo do ATP em ADP, mas também é capaz de gerar AMP a partir do ADP (4 ATP:1 ADP). Esta enzima está presente em estruturas neuronais, onde atua como reguladora dos níveis extracelulares de ATP/ADP, coordenando vários sistemas homeostáticos (Belcher *et al.*, 2006, Burnstock, 2007, Kukulski *et al.*, 2005, Lazarowski *et al.*, 2003, Matsuoka and Ohkubo, 2004, Robson *et al.*, 2006, Zimmermann, 2000). A

NTPDase 8 exerce a sua atividade catalítica sobre o ATP e o ADP (2 ATP:1 ADP). Existe predominantemente no fígado, embora também tenha sido detetada no jejuno e no rim (Bigonnesse *et al.*, 2004). A E-5'-nucleotidase é a enzima que catalisa a formação de adenosina a partir do AMP e tem a característica de estar ancorada à membrana plasmática (Yegutkin, 2008). Esta enzima é na maioria dos tecidos o passo limitante para a formação de adenosina a partir de nucleótidos de adenina libertados (Cardoso *et al.*, 2015, Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Magalhaes-Cardoso *et al.*, 2003). É inibida pelo α,β -metilenoADP (AOPCP), mas existe a possibilidade de utilizar inibidores não nucleotídeos menos potentes, como a concanavalina A (Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Muller *et al.*, 2006). A adenosina desaminase (ADA) é também uma enzima importante responsável pela metabolização da adenosina em inosina; esta enzima está presente entre outros tecidos no íleo de ratas, onde tem um papel muito preponderante (Correia-de-Sa *et al.*, 2006, Duarte-Araujo *et al.*, 2004). Esta enzima é inibida pelo eritro-9- (2-hidroxi-3-nonil)-adenina (EHNA) (Woodson *et al.*, 1998). A purina nucleosídeo fosforilase (PNP), responsável pela formação da hipoxantina a partir da inosina, é uma enzima fundamental na via salvamento de purinas e tem sido estudada principalmente como um alvo para o tratamento de doenças proliferativas, tais como leucemias de células T ou linfomas, rejeição de transplante de órgãos, artrite reumatóide, psoríase, e outras doenças autoimunes (Bzowska, 2000, Montgomery, 1993). Esta enzima é inibida por compostos como a 8-Aminoguanosina e 9-Deazaguanina (Erion *et al.*, 1993, Kazmers *et al.*, 1981).

Quadro 3 - Enzimas extracelulares que metabolizam os nucleótidos e nucleósidos de adenina. Substratos, atividade e inibidores. K_i = constante de inibição

Enzima	Substrato	Inibidor
Ecto - NTPDase 1	Nucleótidos tri e difosfatados (ATP>GTP>ADP)	POM-1(K_i = 2,58 μ M) > ARL 67156 (K_i = 27 μ M),
Ecto - NTPDase 2	Nucleótido trifosfatados	POM-1 (K_i = 28,8 μ M) >>> ARL 67156 (K_i > 1 M),
Ecto - NTPDase 3	Nucleótidos tri e difosfatados (ATP>GTP>ADP)	PSB06126 (K_i = 1,5 μ M) > POM-1 (K_i = 3,26 μ M) > ARL 67156 (K_i = 112 μ M), ,
Ecto - NTPDase 8	Nucleótidos tris e difosfatados (ATP>GTP>ADP)	ARL 67156 (K_i = 100 μ M)
E - 5'-Nucleotidase	Nucleótidos monofosfatados	AOPCP (K_i = 5 nM)
Adenosina Desaminase	Nucleósido Adenosina	EHNA (K_i = 4 nM) APP
Purina nucleosídeo fosforilase (PNP)	Inosina, guanosina	8-Aminoguanosina 9-Deazaguanina (K_i = 1.4 mM)

Fontes: (Antonioli *et al.*, 2013, Baqi *et al.*, 2009, Fernley and Walker, 1967, Knowles and Li, 2006, Levesque *et al.*, 2007, Muller *et al.*, 2006, Naito and Lowenstein, 1985, Wall *et al.*, 2008, Woodson *et al.*, 1998, Kazmers *et al.*, 1981, Erion *et al.*, 1993).

Recentemente, trabalhos realizados por Vieira e col. (2014) mostram que no íleo de ratizona o ATP é metabolizado: com elevada afinidade (10 ATP: 1 ADP) pela NTPDase 2, localizada predominantemente nos gânglios do plexo mioentérico; com afinidade intermédia (4 ATP: 1 ADP) pela NTPDase 3, localizada predominantemente nos gânglios do plexo mioentérico e trajetos nervosos, e com menor afinidade (2 ATP: 1 ADP) pela E-NTPDase 8, localizada predominantemente nos gânglios do plexo mioentérico. O ADP resultante do catabolismo do ATP (predominantemente pela ação da NTPDase 2) é então metabolizado em AMP pelas NTPDase 3 e 8 já referidas (cf. Duarte-Araújo 2009). A NTPDase 1 não é considerada como uma enzima capaz de metabolizar os nucleótidos de adenina no íleo, pois neste tecido ela só parece ser expressa nos vasos sanguíneos (Vieira *et al.*, 2014). O AMP é subsequentemente metabolizado em adenosina pela E-5'-nucleotidase localizada no músculo liso, permitindo a sinalização pela adenosina (Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Duarte-Araujo *et al.*, 2009, Nitahara *et al.*, 1995).

Pode então considerar-se que apesar da sua relevância, a influência das NTPDases nas funções GI é indireta, pois o seu efeito resulta da maior ou menor acumulação extracelular de nucleótidos e nucleósidos ativos, que serão depois capazes de regular diversas funções celulares através da ativação seletiva de recetores purinérgicos P1 e P2 (Figura 8) (Antonioli *et al.*, 2013). A demonstração do envolvimento das NTPDases em processos fisiopatológicos (como na isquémia ou inflamação) faz com que estas sejam consideradas potenciais alvos terapêuticos (Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Gendron *et al.*, 2002, Vieira *et al.*, 2014).

iii. Transportadores de adenosina

O controlo dos níveis extracelulares dos nucleósidos de adenina não resulta apenas do catabolismo do ATP e da desaminação da adenosina. A maioria dos nucleósidos e os seus análogos são moléculas hidrofílicas que requerem proteínas específicas para serem transportados para dentro ou para fora da célula. Os transportadores de nucleósidos (NT) descritos estão classificados como equilibrativos (ENT) - quando transportam nucleósidos de acordo com o seu gradiente de concentração, ou concentrativos (CNT) - quando transportam nucleósidos unidireccionalmente, de forma dependente do gradiente de Na^+ (Figura 7) (Baldwin *et al.*, 2004, Gray *et al.*, 2004, Kong *et al.*, 2004). Os ENT são proteínas de membrana com 11 domínios transmembranares (TMD) que podem ser funcionalmente subdivididos de acordo com a sua sensibilidade a inibidores como a nitrobenziltioinosina (NBTI) e dipiridamol ou diltiazep. O ENT1 é considerado um transportador sensível (ENT_{es}) aos inibidores porque é inibido pelo NBTI ($K_i=0,1-10\text{nM}$) e pelo dipiridamol ou diltiazep. Os ENT2 e 3 são considerados transportadores insensíveis (ENT_{is}) aos inibidores, porque necessitam concentrações muito superiores para se verificar a inibição pelos fármacos referidos anteriormente (Quadro 4). Sabe-se que é a perda dos locais de *N*-glicosilação entre os TMD 3 e 6 que determina essa perda de sensibilidade aos inibidores (Cano-Soldado and Pastor-Anglada, 2012, King *et al.*, 2006, Podgorska, 2006).

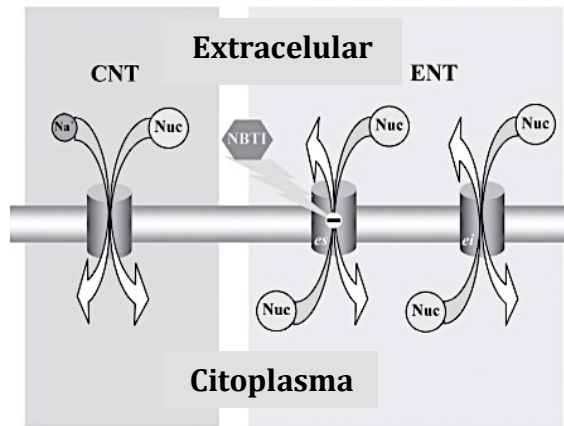


Figura 7 - Modelo do fluxo de nucleósidos mediada por Na^+ , transportadores de nucleosídeos concentrativos (CNT) e de transportadores equilibrativos (ENT) (Adaptado de (Podgorska 2005))

Os CNT são proteínas de membrana com 15 TMD, estando descritos 3 subtipos principais: CNT1, CNT2 e CNT3. Todos transportam uridina, diferindo na seletividade para os restantes substratos. O CNT1 privilegia o transporte de nucleósidos de pirimidina, o CNT2 de nucleósidos de purinas e o CNT3 transporta nucleósidos de pirimidina e purinas. A razão entre o acoplamento de sódio e o transporte de nucleósido é de 1:1 para o CNT1 e 2 e de 1:2 para o CNT3, o único transportador desta família capaz de aceitar protões como alternativa ao sódio com uma estequiometria de 1 sódio: 1 protão: 1 nucleósido (Quadro 4) (Cano-Soldado and Pastor-Anglada, 2012, King *et al.*, 2006, Podgorska *et al.*, 2006). Uma vez que os CNT's são dependes do transporte de sódio, a oubaína parece ser um potente inibidor destes transportadores, visto que é um fármaco potente na inibição da bomba sódio-potássio ATPase (Caruso-Neves *et al.*, 1997, Giordana *et al.*, 1973).

Verifica-se assim que o controlo dos níveis extracelulares dos nucleótidos/nucleósidos de adenina depende não só do seu catabolismo enzimático como também do transporte de nucleósidos através de transportadores específicos. A manutenção de níveis extracelulares adequados de ATP, ADP, AMP e adenosina é essencial para garantir a ativação de recetores purinérgicos e consequentemente desencadear a resposta esperada nos tecidos.

Quadro 4 - Transportadores de nucleósidos concentrativos (CNT) e equilibrativos (ENT). Distribuição, seletividade para o substrato e inibidores

Transportador	Distribuição	Seletividade do substrato e K_m para a adenosina	Inibidores
ENT1	Placenta, fígado, coração, baço, rim, pulmão, cólon e cérebro	Nucleósidos de purinas e pirimidinas ($K_m=40 \mu\text{M}$)	NBTI <<Dipiridamol
ENT2	Ubíquo, predominantemente abundante no músculo-esquelético	Nucleósidos de purinas e pirimidinas e nucleobases ($K_m=140 \mu\text{M}$)	<< NBTI < < Dipiridamol
ENT3	Ubíquo, predominante nas membranas intracelulares	Nucleósidos de purinas e pirimidinas e algumas nucleobases ($K_m=1.9 \text{ mM}$)	< < NBTI < < Dipiridamol
ENT4	Ubíquo	Catiões orgânicos incluindo monoaminas e adenosina	
CNT1	Jejuno, rins, fígado, intestino delgado, cérebro	Nucleósidos de pirimidina e adenosina ($K_m=50 \mu\text{M}$) 1 Na^+ : 1 nucleósido	Oubaína
CNT2	Rim, fígado, intestino delgado, cólon, recto, coração, cérebro, placenta, pâncreas, baço, músculo esquelético	Nucleósidos de purinas e uridina ($K_m=8 \mu\text{M}$) 2 Na^+ : 1 nucleósido	Oubaína
CNT3	Medula óssea, pâncreas, traqueia, da glândula mamária, placenta, intestino, pulmão, rim, fígado, próstata, testículo	Nucleósidos de purinas e pirimidinas ($K_m=15 \mu\text{M}$) 1 Na^+ : 2 nucleósidos	Oubaína

Fonte: (Govindarajan *et al.*, 2007, Gray *et al.*, 2004, King *et al.*, 2006, Rose and Coe, 2008, Podgorska, 2006)

iv. Recetores purinérgicos

Os recetores purinérgicos inicialmente descritos em 1976 (Burnstock, 1976) foram dois anos depois diferenciados farmacologicamente em recetores P1 (sensíveis à adenosina, bloqueados pelas metilxantinas) e P2 (sensíveis ao ATP/ADP, bloqueados pela quinidina e outros fármacos não seletivos). Mais tarde foram identificadas as bases farmacológicas e moleculares que permitiram subdividir a família dos recetores P2 em P2X (recetores ionotrópicos) e P2Y (recetores metabotrópicos) (Figura 8) (Abbracchio *et al.*, 2006, Abbracchio *et al.*, 2009, Baroja-Mazo *et al.*, 2013, Burnstock, 1976, Burnstock, 2003, Burnstock, 2007, Dunn *et al.*, 2001, Edwards *et al.*, 1992, Evans *et al.*, 1992, Silinsky *et al.*, 1992).

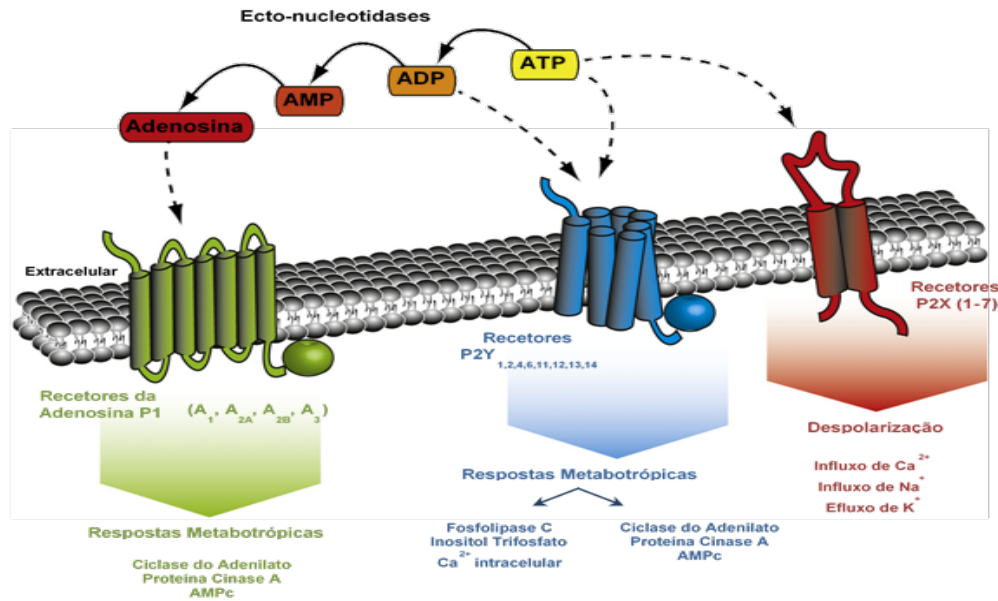


Figura 8 - Subtipos de recetores purinérgicos. P2X ionotrópicos sensíveis ao ATP (P2X1-7); P2Y metabotrópicos sensíveis ao ATP e ADP (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) e P1 metabotrópicos sensíveis à adenosina (A1, A2A, A2B, A3). (Adaptado de (Baroja-Mazo *et al.*, 2013)).

a) Recetores do subtipo P2

Os recetores P2 medeiam os efeitos extracelulares dos nucleótidos de adenina e uracilo (ATP, ADP, UTP, UDP) e têm uma participação ativa em praticamente todos os processos fisiológicos. Este tipo de recetores subdivide-se em duas classes: os recetores P2X e P2Y. Os recetores P2X são constituídos por 3 subunidades de 7 tipos diferentes (1-7), que podem formar canais homoméricos (com todas as subunidades de um só tipo) ou heteroméricos (constituídos por subunidades de tipos diferentes). São canais iónicos ativados por ligandos que exercem a sua ação rapidamente (em milissegundos), por alteração da permeabilidade da membrana celular a catiões como o Na^+ ou o Ca^{2+} (Abbracchio *et al.*, 2006, Burnstock, 2007). Quanto aos recetores P2Y, são recetores metabotrópicos com 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G - logo de funcionamento mais lento que os anteriores, na escala dos segundos. Até à data foram identificados 8 subtipos diferentes: P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}. Alguns recetores P2Y são ativados por nucleósidos difosfatados (como os P2Y_{1,6,12,13}) enquanto outros, como os P2Y_{2,4,11}, são preferencialmente ativados por nucleósidos trifosfatados. Paralelamente, os recetores P2Y_{2,4,6} são ativados por purinas e pirimidinas, enquanto os recetores P2Y_{1,11,12,13} apenas o são por purinas (Abbracchio *et al.*, 2006, Burnstock, 2007). No Quadro 5 estão

representados os diferentes tipos de recetores de ATP, P2Y e P2X, assim como os seus respetivos agonistas e antagonistas.

Quadro 5 - Perfil farmacológico (agonistas e antagonistas) dos recetores P2X e P2Y.

Recetor	Agonistas	Antagonistas	Recetor	Agonistas	Antagonistas
P2X			P2Y		
P2X1	α, β -meATP = ATP = 2-MeSATP, L β, γ -meATP (rápida dessensibilização)	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449	P2Y₁	2-MeSADP = ADP β S, INS 37217, INS 365	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT
P2X2	ATP \geq ATP γ S \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP (pH + sensibilidade ao Zinco)	Suramina, isoPPADS, RB2, NF770, NF279	P2Y₂	UTP = ATP, UTP γ S, INS 37217, INS 365	Suramina \gg RB2, ARC126313
P2X3	2-MeSATP \geq ATP \geq α, β -meATP \geq AP4A (rápida dessensibilização)	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip5I, Vermelho fenol	P2Y₄	UTP \geq ATP, UTP γ S, INS 37217	RB2 > Suramina
P2X4	ATP \geq α, β -meATP, CTP, potenciação ivermectina	TNP-ATP (fraco), BBG (fraco), Fenolftaleína	P2Y₆	UDP \gg UTP > ATP, UTP γ S, IDP	MRS2578
P2X6	(Não funciona como homomultímero)	-	P2Y₁₂	2-MeSATP \geq ADP \gg ATP	CT50547, AZD6140, PSB0413, ARL66096
P2X7	BzATP > ATP \geq 2-MeSATP \gg α, β -meATP	BBG, KN62, KN04, O-ATP, A438079, MRS2427, Coomassie blue	P2Y₁₃	ADP = 2-MeSADP \gg ATP = 2-MeSATP	MRS2211, 2-MeSAMP
			P2Y₁₄	Glucose UDP = Galactose UDP	-

Fonte: (Abbracchio *et al.*, 2006, Burnstock, 2007, Gever *et al.*, 2006, Jarvis and Khakh, 2009, Sperlagh and Vizi, 2007, Webb *et al.*, 1993, van Calcar *et al.*, 1979).

b) Recetores P1 da Adenosina

As ações biológicas da adenosina são mediadas por 4 subtipos de recetores transmembranares acoplados à proteína G: A₁, A_{2A} (elevada afinidade), A_{2B} e A₃ (baixa afinidade). Classicamente, os recetores P1 ímpares (A₁ e A₃) exercem um efeito inibitório mediado por uma proteína G_i que inibe a ciclase do adenilato, reduzindo a quantidade intracelular de AMP cíclico produzido (van Calcar *et al.*, 1979). Contrariamente, os recetores A_{2A} e A_{2B} aumentam a quantidade intracelular de AMP cíclico produzido, por ação da proteína G_s. Tem por esse motivo um papel facilitatório. Assim sendo, é compreensível que a capacidade da adenosina para regular funções biológicas esteja relacionada com a sua concentração extracelular. Como já foi referido os níveis extracelulares de adenosina são determinados por uma variedade de mecanismos, que incluem a sua biossíntese intracelular e extracelular, o seu transporte e metabolismo. Está descrito que os recetores de elevada afinidade (A₁, A_{2A}) desempenham um importante papel fisiológico, enquanto os recetores de baixa afinidade (A_{2B} e A₃) assumem maior relevância apenas em situações patológicas, quando os níveis extracelulares de adenosina se encontram aumentados – como na hipoxia, inflamação ou isquémia (Antonioli *et al.*, 2008, Bozarov *et al.*, 2009, Cronstein, 1995, Fredholm *et al.*, 2000, Klotz, 2000, Noji *et al.*, 2004, Sitkovsky and Ohta, 2005).

No Quadro 6 estão representados os diferentes tipos de recetores metabotrópicos P1, assim como os seus respetivos agonistas e antagonistas.

Quadro 6 - Perfil farmacológico (agonistas e antagonistas) dos recetores P1.

Recetor	Agonistas	Antagonistas
P1		
A₁	CCPA, CPA, S-ENBA, CVT-510, R-PIA	DPCPX, N-0840, MRS1754, WRC-0571
A_{2A}	CGS 21680, HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, KW 6002
A_{2B}	NECA (não-seletivo)	MRE2029-F20, MRS1706, MRS17541, Emprofilina
A₃	2-CI-IB-MECA, IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504

Fonte: (Burnstock, 2007, Ciruela *et al.*, 2010, Fredholm *et al.*, 2001, Jacobson, 2009, Jacobson and Gao, 2006).

Os recetores purinérgicos encontram-se amplamente distribuídos no sistema gastrointestinal. Encontram-se localizados em várias células intestinais (como as células neuronais, gliais, epiteliais e imunes) dotadas de vias metabólicas complexas, essenciais para moldar a sinalização purinérgica de acordo com as variações das condições e da saúde do tecido.

6. Neuromodulação purinérgica no plexo mioentérico do íleo de ratazana e implicações fisiopatológicas

A motilidade gastrointestinal é dependente da libertação de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores, dos quais se destacam a ACh e a SP pelo seu papel excitatório e o NO, VIP e ATP pelo papel inibitório que exercem. Quanto à ACh, para além de ser conhecido o seu papel como principal neurotransmissor excitatório do SNE, é também sabido que a sua libertação pode ser modulada por purinas, como o ATP e a adenosina (Burnstock, 1976, Burnstock *et al.*, 1970, Costa *et al.*, 2000, Harrington *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas o conceito de neuromodulação purinérgica evoluiu de forma significativa, reconhecendo-se hoje a sua importância na fisiopatologia gastrointestinal. Em 2004 foi possível compreender que no plexo mioentérico de íleo de ratazana a adenosina modulava a libertação de acetilcolina a partir de neurónios mioentéricos, ativando recetores juncionais facilitatórios A_{2A} e recetores extra-juncionais inibitórios A_1 (Duarte-Araujo *et al.*, 2004). Trabalhos posteriores, com recurso à imunofluorescência aplicada à microscopia confocal, permitiram esclarecer que os recetores inibitórios A_1 estão localizados nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos, juntamente com recetores facilitatórios de baixa afinidade A_3 . Os recetores A_{2A} localizam-se nos terminais colinérgicos e os recetores A_{2B} encontram-se expressos nas células gliais mioentéricas (Vieira *et al.*, 2011). A adenosina é transportada por intermédio de ENT (sensíveis ao dipiridamol) para o meio extracelular, mas também pode resultar do catabolismo extracelular do ATP, situação que se verifica apenas para estímulos mais prolongados. Os níveis extracelulares da adenosina são controlados principalmente pela sua desaminação em inosina, mas a recaptção também contribui para restringir a ação da adenosina aos seus locais de libertação/produção (Duarte-Araujo *et al.*, 2004). A neurotransmissão colinérgica pode ainda sofrer um fenómeno de amplificação pela ativação de recetores

muscarínicos M_3 localizados nas ICC-IM, com subsequente aumento do transporte de adenosina e ativação de recetores A_{2A} localizados nos terminais nervosos desta complexa sinapse mioentérica tripartida (Silva I, 2011).

Quanto aos nucleótidos de adenina, em 2009 ficou demonstrada a existência de um efeito bifásico do ATP no PM-ML de íleo de ratazana. O efeito facilitatório sobre a libertação basal de ACh deve-se à ativação direta de recetores ionotrópicos P2X, provavelmente do subtipo P2X2, localizados nos terminais mioentéricos (Duarte-Araujo *et al.*, 2009). Já o efeito inibitório resulta da formação de ADP e ADO a partir do catabolismo do ATP, com subsequente ativação de recetores $P2Y_1$ e A_1 presentes nos neurónios mioentéricos, que diminuem assim a libertação de ACh induzida pela estimulação elétrica (Duarte-Araujo *et al.*, 2009, Giaroni *et al.*, 1999). Recentemente ficou esclarecido que a NTPDase 1 não se encontra presente no plexo mioentérico de íleo de ratazana (Vieira *et al.*, 2014), sendo o ATP preferencialmente catabolizado em ADP pela NTPDase 2 localizada nos neurónios e glia mioentéricos, permitindo a ativação de recetores $P2Y_1$ inibitórios. A metabolização do ATP/ADP catalisada pela NTPDase 3 (mais abundante que a NTPDase 8) presente no componente nervoso da sinapse mioentérica origina rapidamente AMP. O AMP é subsequentemente metabolizado em ADO pela E-5'-nucleotidase ligada às fibras musculares, na proximidade dos recetores A_{2A} facilitatórios que são assim ativados (Duarte-Araújo M, 2014) (Figura 9).

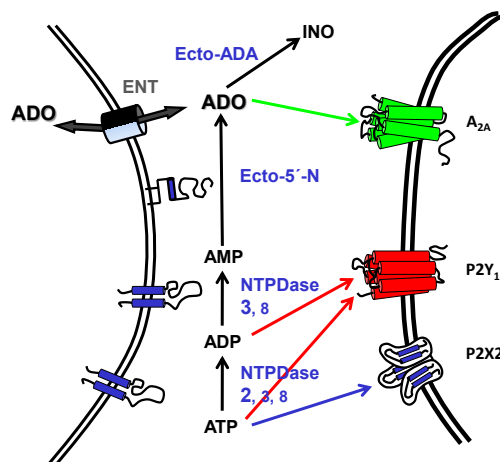


Figura 9 - Cascata purinérgica mioentérica. Enzimas envolvidas no catabolismo extracelular do ATP no plexo mioentérico de íleo de ratazana. Ativação sequencial de recetores purinérgicos P2X2, $P2Y_1$ e A_{2A} pelos metabolitos ativos formados. (Imagem cedida por Margarida Duarte-Araújo)

Apesar de se conhecer grande parte da distribuição dos recetores das purinas no trato GI, o seu papel na fisiopatologia de muitas alterações GI permanece controverso. Está descrito que após lesão e durante fenómenos isquémicos ou inflamatórios os níveis extracelulares de ATP aumentam, alterando a excitabilidade dos neurónios aferentes a estímulos mecânicos e químicos, modificando a percepção dolorosa (Antonioli *et al.*, 2008, Bornstein, 2008, Burnstock, 2006, Ren and Bertrand, 2008). Também nas disfunções da motilidade GI, como no íleo paralítico ou na síndrome do cólon irritável que cursa com obstipação, foi sugerida a utilização de agonistas P2X, ficando o uso de antagonistas destes mesmos recetores reservado para situações em que a diarreia predomina, como acontece em alguns tipos de doença inflamatória intestinal (Burnstock, 2008, Szentpali *et al.*, 2001, Xiang and Burnstock, 2004).

Mas o envolvimento das purinas na fisiopatologia das doenças GI não se resume ao potencial efeito do ATP. De fato, o envolvimento da adenosina em todas as circunstâncias patológicas acima descritas foi também demonstrado (Antonioli *et al.*, 2008, Christofi, 2008, Cooke *et al.*, 2003) e recentemente vários agonistas dos recetores P1 (agonistas A_{2A}, A_{2B} e A₃) foram testados em diferentes modelos animais de doença inflamatória intestinal, assim como alguns inibidores enzimáticos (inibidores da adenosina desaminase ou da adenosina cinase, por exemplo) e inibidores dos transportadores de nucleósidos (Antonioli *et al.*, 2008, Kolachala *et al.*, 2008).

Quanto ao papel das purinas nas alterações digestivas que cursam com a diabetes, a bibliografia é escassa ou inexistente. Sabe-se que a neurotransmissão se encontra alterada, mas os estudos são muitas vezes contraditórios. Recorrendo a roedores com DM tipo 1 (induzida pela STZ), observou-se a diminuição do número dos neurónios entéricos (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007b, Yarandi and Srinivasan, 2014). Contudo, apesar do NO estar reduzido nos terminais nitrérgicos existentes na camada muscular, não se verifica uma diminuição do número de neurónios nNOS positivos no SNE. Os autores sugerem que pode haver uma deficiência induzida pela diabetes no transporte da nNOS dos corpos celulares para os terminais nervosos (Watkins *et al.*, 2000), resultando num deficiente relaxamento do músculo gástrico e posterior diminuição da capacidade gástrica. Adicionalmente a DM pode ainda alterar a expressão de neuropéptidos, como o VIP, a SP e o CGRP. No íleo de ratas diabéticas a estimulação elétrica não conseguiu aumentar a libertação de VIP e CGRP, mas a libertação endógena de ACh, serotonina e SP sofreu um

aumento semelhante à de animais controlo (Belai *et al.*, 1987, Yarandi and Srinivasan, 2014).

Em relação à sinalização purinérgica no trato gastrointestinal, não há dados que mostrem um ajuste dos níveis extracelulares de purinas ou dos seus recetores na diabetes. No entanto, existem evidências indiretas que descrevem o comprometimento do relaxamento mediado por neurónios nitrérgicos no duodeno de ratas STZ. A resposta ao dador de NO manteve-se inalterada nestes animais, mas a resposta ao ATP estava aumentada. Curiosamente, estudos realizados com ratas STZ demonstraram que existe uma diminuição na concentração de ATP no fluido cerebrospinal, associado a uma diminuição na densidade de recetores P2X_{3,5,7} e de recetores P2Y_{2,6,11} nos terminais nervosos do hipocampo. Por outro lado, verificou-se um aumento dos recetores P2X_{1,2,5,6,7} e P2Y₆ (mas não P2Y₂) nas membranas dos astrócitos/neurónios, indicando alterações na neuro e gliotransmissão (Duarte *et al.*, 2007). Cunha e colaboradores verificaram ainda que no hipocampo de ratas STZ os recetores A₁ estavam reprimidos enquanto os recetores A_{2A} estavam sobre expressos (Duarte *et al.*, 2006). Um outro grupo de investigadores verificou que existe uma redução da recaptção de adenosina no hipocampo de ratas diabéticas, podendo consequentemente aumentar a sensibilidade à adenosina na sinapse (Burnstock and Novak, 2013, Morrison *et al.*, 1992). Adicionalmente, Coulson e colaboradores demonstraram que existem alterações nos recetores muscarínicos M₂ e M₃ e que a disfunção dos recetores muscarínicos neuronais M₂ no íleo podem também contribuir para a dismotilidade gastrointestinal associada à diabetes (Coulson *et al.*, 2002).

Consideramos por isso relevante tentar perceber se existe uma adaptação da “cascata purinérgica” mioentérica nas dismotilidades diabéticas e se as purinas se poderão perfilar como potências alvos terapêuticos para restituir a funcionalidade GI.

II. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo central compreender se a sinalização purinérgica mioentérica se encontra alterada na *Diabetes mellitus* do tipo 1, uma vez que nesta patologia se observam com muita frequência distúrbios da motilidade intestinal.

Para realizar esse estudo foi necessário implementar pela primeira vez no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS um modelo animal de DM tipo 1 na ratazana induzido pela administração de uma dose única (55 mg/kg IP) de estreptozotocina (STZ).

A validação do modelo animal foi feita pela avaliação clínica durante 14 dias. Parâmetros como o peso do animal, o seu consumo de água, comida e perfil glicémico foram comparados entre o grupo de animais controlo (CTRL) e diabético (STZ).

Do ponto de vista das alterações gastrointestinais avaliou-se o aspeto macroscópico do tubo digestivo (e.g. peso do cego e do íleo corrigido pelo tamanho da tibia) e a sua atividade motora, nomeadamente a motilidade gastrointestinal *in vivo* e a contração muscular isométrica *in vitro*, em animais controlo e diabéticos.

As alterações da neuromodulação purinérgica no plexo mioentérico do íleo dos animais diabéticos foram comparadas com o grupo controlo. Para tal, avaliou-se o papel de agonistas seletivos dos receptores de elevada afinidade para a adenosina, A₁ (inibitórios) e A_{2A} (facilitatórios) na libertação de ACh pelas terminações nervosas motoras. Também se investigou possíveis variações na origem e inativação (por recaptção e desaminação extracelular) da adenosina no plexo mioentérico dos animais diabéticos que poderiam justificar as alterações na neuromodulação purinérgica observadas. Neste âmbito estudou-se o catabolismo extracelular do ATP e dos seus metabolitos (incluindo a adenosina) por HPLC. Os estudos funcionais foram acompanhados por ensaios imagiológicos (microscopia confocal) dos principais intervenientes na “cascata purinérgica”.

Este trabalho pretende contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da dismotilidade intestinal diabética e avaliar se a neuromodulação purinérgica poderá ser um alvo terapêutico a considerar para combater as desordens GI observadas nesta patologia.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina

Foram utilizados neste estudo machos da espécie *Rattus norvegicus* da estirpe Wistar Han (Biotério do ICBAS-UP, Porto, Portugal), com 300-450 gramas de peso. Estes animais foram mantidos a uma temperatura constante de 21°C, com humidade entre os 40 e os 60%, com períodos alternados de luminosidade/obscuridade de 12 horas, tendo acesso a comida e água *ad libitum*. A manipulação animal e os procedimentos experimentais decorreram de acordo com as orientações definidas pela entidade que tutela a experimentação animal em Portugal, a DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária), segundo o disposto no decreto-lei nº 113 de 7 de agosto de 2013.

A DM foi induzida num grupo de animais através de uma injeção i.p. única com uma solução de estreptozotocina (STZ, 55 mg/kg, em 0.1 N de tampão citrato, pH 4,5). A avaliação da glicemia foi realizada antes da indução e, subsequentemente, 48 horas, 7 e 14 dias após. A concentração de glucose no sangue foi determinada pelo método da glucose-oxidase, utilizando um dispositivo portátil de monitorização da glucose sanguínea (OneTouchVita). As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia da cauda. Todos os animais com valores de glicemia superiores a 250mg/dL foram considerados diabéticos. Só foram incluídos no estudo (grupo diabético STZ) animais com valores de glucose sanguínea mantidos acima dos 300 mg/dL durante 14 dias (King, 2012). Durante esse período de tempo foram realizadas monitorizações diárias para avaliar o bem-estar animal. Os animais injetados apenas com solução tampão de citrato foram utilizados como controlos (grupo CTRL).

Alguns animais dos grupos CTRL e STZ foram submetidos a uma avaliação mais detalhada ao longo de todo o protocolo, na qual se procedeu à avaliação do consumo de água e ração diárias, assim como à evolução do peso ao longo dos 14 dias. Foi ainda avaliado neste grupo de animais o estado da “cama”, incluindo o aspeto das fezes. Este estudo foi realizado diariamente no Biotério do ICBAS-UP com o auxílio dos tratadores.

2. Avaliação da motilidade gastrointestinal:

A avaliação da motilidade gastrointestinal (GI) foi realizada *in vivo* quantificando a

progressão do corante azul-de-metileno ao longo do tubo digestivo (Vieira *et al.*, 2014).

Após um período de 4 horas em jejum, cada animal foi anestesiado brevemente com isoflurano, por via inalatória. O corante azul-de-metileno (10%) foi depois introduzido no estômago com o auxílio de sonda orogástrica adequada à espécie. Após um período de 30 minutos, os animais foram sacrificados e todo o sistema GI foi removido. A progressão de azul-de-metileno quantificada em centímetros foi normalizada pelo comprimento total do intestino delgado no mesmo animal.

3. Colheita de tecidos: disseção do íleo de ratazana e isolamento da preparação músculo longitudinal - plexo mioentérico

Os animais do grupo CTRL e STZ (14 a 16 dias após a indução) foram ocisados por decapitação com guilhotina (Sistema Stolting 51330). Após laparotomia mediana o cego foi identificado e o íleo separado das aderências mesentéricas e pedículos vascular-nervosos com o auxílio de material cirúrgico adequado (Figura 10). Em cada animal isolou-se uma porção de íleo de aproximadamente 12 cm de comprimento, excluindo o último centímetro junto à válvula íleocecal. Foram ainda retirados o cego e a tibia (utilizada para a normalização do peso do cego) de alguns animais CTRL e STZ.

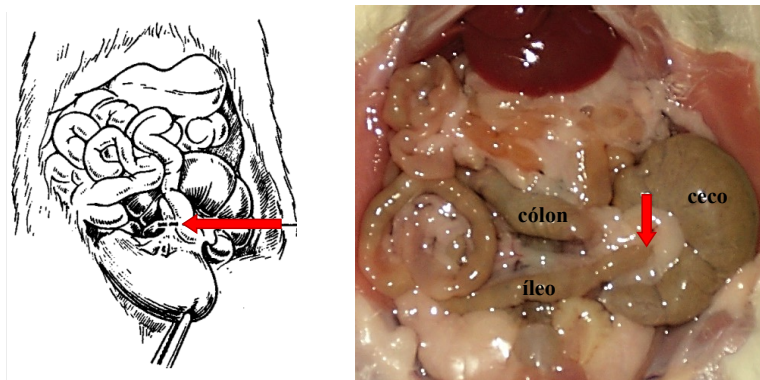


Figura 10 - Aspecto da cavidade abdominal de ratazana após laparotomia mediana. Identificação do cego, íleo e cólon. A seta a vermelho identifica a união íleoecal.

O íleo foi de seguida colocado numa placa de Petri com solução Tyrode (constituída por (mM): NaCl, 137; KCl, 2,7; CaCl₂, 1,8; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 0,4; NaHCO₃, 11,9; glucose, 11,2, pH 7.4) previamente oxigenada (com 95% de O₂ e 5% de CO₂) à temperatura

ambiente. O conteúdo do intestino foi então esvaziado com o auxílio de uma seringa com solução Tyrode introduzida no lúmen do intestino (Figura 11 a).

O íleo foi depois fracionado em porções menores (1 cm de comprimento) e reservado para experiências de contração muscular ou preservado para estudos imagiológicos.

Nas experiências para quantificar a libertação de [^3H]ACh, para o estudo da cinética do catabolismo extracelular dos nucleótidos / nucleósidos de adenina e, também, para os estudos imagiológicos foram utilizadas preparações de músculo longitudinal-plexo mioentérico (ML-PM). Esta preparação com o plexo mioentérico preservado entre as camadas de músculo longitudinal (intacto) e circular (residual) foi preparada segundo o método descrito inicialmente por Ambache nos anos cinquenta, do século XX, adaptada para utilizar em íleo de cobaias na década seguinte e otimizada por este grupo de trabalho para ratazanas, segundo o descrito nos trabalhos de 2004 (Ambache, 1954, Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Paton and Vizi, 1969, Paton and Zar, 1968). Resumidamente, esta técnica consiste na introdução de uma porção de íleo numa pipeta de vidro, fazendo de seguida uma incisão leve no lado oposto ao bordo mesentérico e ao longo do seu eixo maior (Figura 11 b). O músculo longitudinal com o plexo mioentérico aderente é então separado da maior parte da camada muscular circular com o auxílio de gases embebida em solução Tyrode, resultando na preparação ML-PM que se pode observar na (Figura 11 c).

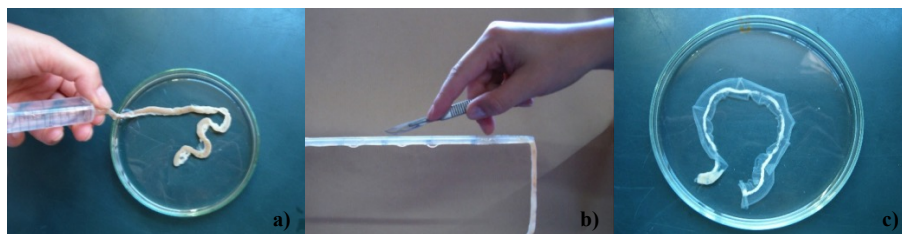


Figura 11 - Preparação músculo longitudinal – plexo mioentérico (ML-PM) de íleo de ratazana. a) fragmento de íleo isolado lavado com solução de Tyrode, com o auxílio de uma seringa; b) incisão ao longo do eixo maior do íleo inserido numa pipeta de vidro; c) aspeto da preparação ML-PM numa placa de petri com solução de Tyrode.

Atendendo às evidentes alterações macroscópicas observadas no aparelho GI do grupo de animais STZ, procedeu-se à comparação do peso do cego (em grama, gr) entre animais controlo e diabéticos. O peso deste tecido foi imediatamente avaliado após a sua remoção,

sendo posteriormente normalizado para o comprimento da tíbia (peso do cego/comprimento da tíbia) do mesmo animal.

Também se procedeu à remoção e pesagem (em miligrama, mg) de porções de íleo com 1 cm de comprimento. A pesagem de porções de íleo imediatamente após o seu isolamento e remoção do conteúdo intestinal deu origem ao designado “peso a fresco”. A pesagem dos mesmos fragmentos deixados a secar ao ar ambiente durante 48 horas foi considerado o “peso a seco” dos tecidos.

4. Registos miográficos das contrações isométricas

Fragmentos de íleo com 1 cm de comprimento foram montados em banhos de órgãos verticais com 14 mL de capacidade e perfundidos continuamente com uma solução de Tyrode oxigenada, a 37°C. Os tecidos foram fixados por uma das extremidades a um suporte de acrílico e pela outra a um transdutor de força isométrica (MLT050/D, ADInstruments, Colorado Springs, CO), de modo a avaliar as contrações isométricas do íleo. A tensão isométrica foi registada continuamente usando um transdutor de força ligado a um sistema informatizado de aquisição de dados PowerLab (Chart 5, version 4.2; ADInstruments, Colorado Springs, CO). As experiências foram realizadas em tecidos pré-estirados com uma tensão aproximada de 9,8 mN e equilibrados numa perfusão contínua com solução de Tyrode por um período de tempo de 40-60 minutos. Os fragmentos de íleo foram de seguida incubados durante 15 minutos numa solução de Tyrode. Foram considerados aptos para a realização dos protocolos experimentais os tecidos que atingissem valores de frequência e amplitude de contração espontânea estáveis durante pelo menos 5 minutos (Figura 12). As preparações foram incubadas com concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 1 nM a 10 mM) ou através da aplicação única do bloqueador do potencial de ação nervoso, TTX (1 μ M), ou do inibidor dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem de tipo T existentes nas ICC, mibefradil (3 μ M).

i. Tratamento dos dados e análise estatística

Foram analisadas as contrações isométricas antes e após a aplicação de cada um dos fármacos testados. A partir dos sinais registados pelo sistema PowerLab analisou-se a frequência e a amplitude (força contráctil) das contrações musculares espontâneas. A

frequência foi determinada a partir do número de contrações ocorridas durante 20 segundos antes (frequência controlo) e após a aplicação de um fármaco. O valor obtido foi multiplicado por 3, obtendo-se assim o número de contrações por minuto. A força contráctil foi determinada pela diferença entre a força máxima desenvolvida em cada contração e a força de estiramento basal do tecido medidas imediatamente antes (amplitude controlo) e após a aplicação do fármaco a testar. Os resultados são apresentados como percentagens de variação em relação ao valor basal, obtido antes da administração do fármaco a testar.

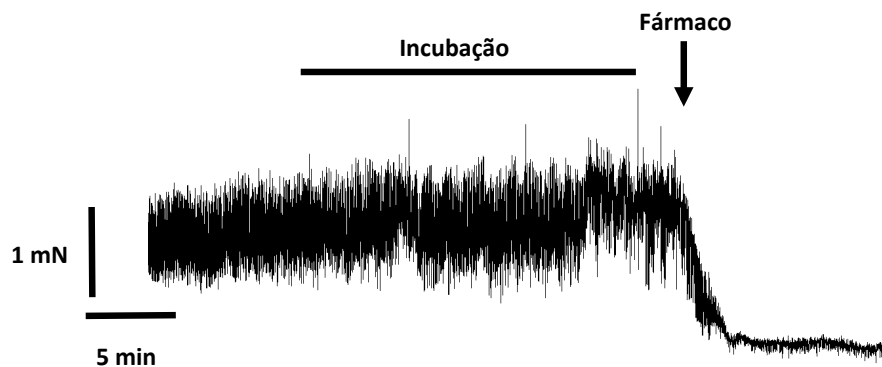


Figura 12 - Registo miográfico da atividade espontânea do íleo de ratazana.

Os resultados foram representados graficamente e analisados utilizando o software PRISM[®] 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Todos os dados são apresentados como média \pm S.E.M para um número n de experiências, onde cada n corresponde a um animal. A análise estatística dos dados foi obtida através da utilização de um teste t Student desemparelhado ou análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas com o pós-teste Bonferroni. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas valores de $P < 0,05$.

5. Cinéticas do catabolismo extracelular das purinas

i. Preparação e montagem do plexo mioentérico de ratazana.

Preparações de ML-PM com 5 cm de comprimento obtidas a partir de animais CTRL e STZ foram fixadas com alfinetes cirúrgicos a um banho de órgãos horizontal com 2 ml de

capacidade, revestido por uma camada fina de Sylgard®. As preparações foram mantidas a 37 °C através da circulação de água pelo compartimento exterior à câmara de perfusão a partir de um banho termostaticado (SBS®). O débito de perfusão das preparações com soluções de tyrode oxigenadas foi assegurado pela utilização de uma bomba peristáltica (Gilson Manipuls3). As incubações ou as perfusões foram mantidas em agitação constante através do arejamento com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%).

ii. Protocolo Experimental

No esquema seguinte (Figura 13) está representado o protocolo experimental utilizado para determinar a cinética do catabolismo dos nucleótidos e nucleósidos de adenina em animais controlo e diabéticos.



Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental das cinéticas de ATP, AMP, ADO e INO em preparações de PM-ML.

Após montagem das preparações no banho de órgãos procedeu-se a um período de lavagem com um fluxo de 15 ml/min, durante 5 min, seguido de um período de equilíbrio de 30 min com um fluxo de 5 ml/min, para garantir que as preparações ficassem equilibradas com o meio fisiológico e que os resíduos tecidulares resultantes da disseção fossem eliminados. As preparações foram posteriormente incubadas com 2 mL de Tyrode, durante 45 min, na ausência de nucleótidos (Cinética Controlo). Foram recolhidas amostras de 75 µL do líquido de incubação aos tempos 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos. Esta primeira cinética permite detetar eventual libertação espontânea de nucleótidos e nucleósidos a partir das preparações ao longo do período de incubação. As amostras foram recolhidas para tubos “eppendorf”, imediatamente congeladas em azoto líquido e conservadas a -80.° C até serem analisadas por HPLC. Seguidamente foi realizada uma segunda incubação da preparação na presença dos nucleótidos e nucleósido da adenina em estudo. O procedimento adotado foi idêntico à Cinética Controlo, mas nesta circunstância as preparações foram incubadas durante 45 minutos na presença do substrato

nucleotídeo/nucleosídico pretendido, *i.e.* ATP, AMP, ADO ou INO, na concentração de 30 μ M. Os inibidores enzimáticos foram pré-incubados com as preparações durante pelo menos 10 minutos seguindo o seguinte procedimento: perfusão (15 mL/min) com a solução de Tyrode durante 2 minutos, seguida da incubação com a solução contendo o inibidor por períodos de 2 minutos cada até perfazer 10 minutos antes da realização da Cinética Teste com o substrato de interesse.

iii. Separação e quantificação dos nucleótidos de adenina e dos seus produtos de catabolismo por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (HPLC-UV)

a) Instrumentação

As análises quantitativas do teor de ATP, AMP, ADO, INO e dos seus metabolitos no líquido de incubação foram realizadas através de um sistema cromatográfico LC/UV composto por uma bomba de gradiente quaternário (*L-2130*, Elite LaChrom), equipado com uma válvula de injeção manual (*Rheodyne 7725*) com ansas de 20 μ L e 200 μ L, ligado a um detetor UV (*L-2400*, Elite LaChrom) com comprimento de onda fixado a 254 nm. Este sistema cromatográfico encontrava-se ligado a um programa informático EZ-ChromElite (VWR International) para processamento dos dados (registo e tratamento quantitativo dos cromatogramas). A separação foi realizada, à temperatura ambiente, com uma coluna de fase inversa de 12,5 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, constituída por partículas de 5 μ m de diâmetro (*LiChrospher 100 RP-18*, Merck), e protegida por uma coluna de guarda com o mesmo enchimento (*LiChrospher 100 RP-18*, Merck).

b) Processo de separação por HPLC-UV

A separação do ATP, AMP, ADO, INO e dos seus produtos de catabolismo foi realizada por cromatografia de par iónico em fase inversa segundo o método descrito por Cascalheira e Sebastião (1992), com pequenas modificações (Cascalheira and Sebastiao, 1992). O eluente, pH 6.0, era constituído por KH_2PO_4 60 mM, tetrabutilamónio 5 mM, e 5-35% (vol/vol) de metanol. O programa de eluição foi o seguinte: 10 minutos de um

gradiente linear de 5% a 35% (vol/vol) de metanol após os quais era realizado um gradiente linear descendente num período de 8 minutos reestabelecendo as condições iniciais de eluição, assim como os valores de absorvância e pressão interna do sistema. O fluxo da fase móvel foi de 1,25 ml/min. A identificação cromatográfica das amostras contendo nucleótidos e nucleósidos foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de padrões de pureza elevada separados nas mesmas condições cromatográficas. Os tempos de retenção típicos (minutos) foram os seguintes: ATP (8,64); ADP (7,53); AMP (5,49); Adenosina (4,54); IMP (3,51); Inosina (2,47); Hipoxantina (1,53). Os cromatogramas obtidos após separação do ATP e seus metabolitos após injeção de 20 μ L de soluções provenientes de padrões e amostras estão representados na Figura 14.

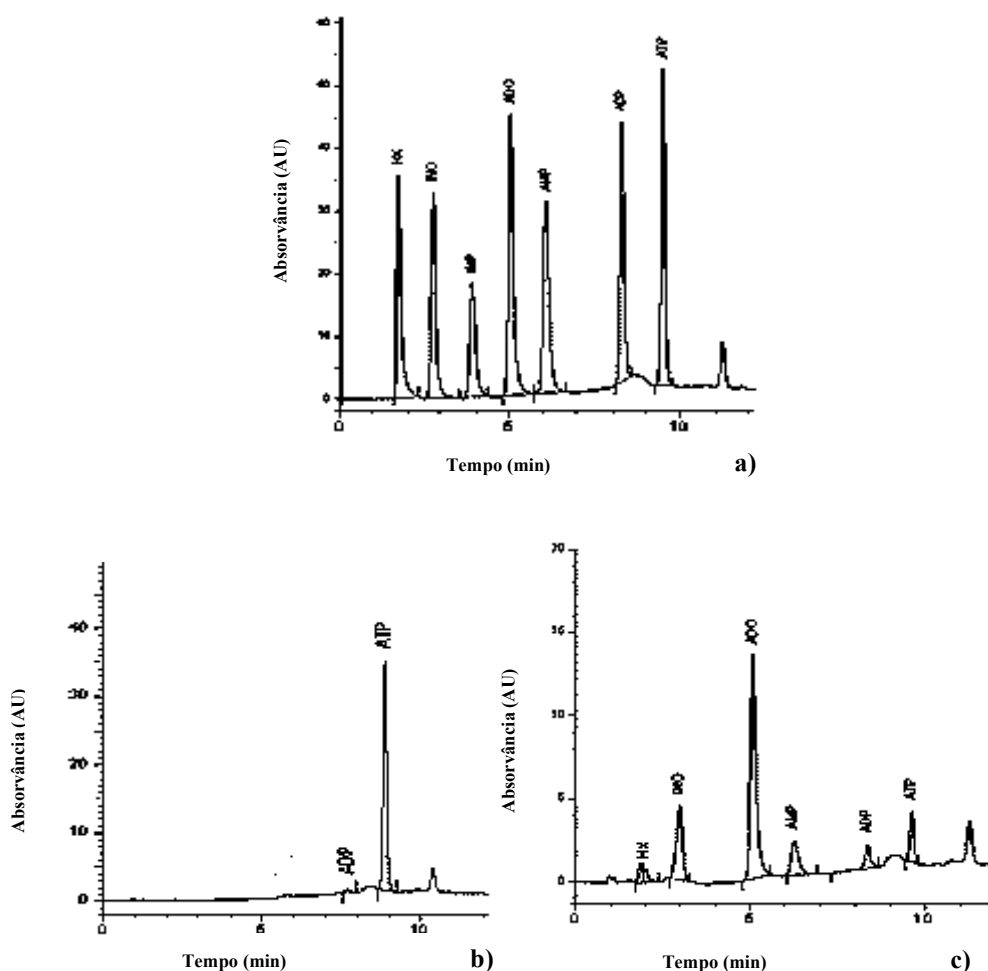


Figura 14 - Cromatogramas de HPLC-UV, (a) representação da separação típica de uma solução padrão de nucleótidos e nucleósidos de adenina na concentração de 30 μ M; (b) e (c) separação obtida a partir de amostras colhidas do banho logo imediatamente após adição de ATP 30 μ M (0 min) e após incubação durante 45 min, respetivamente.

c) Quantificação do ATP e metabolitos

O método de quantificação utilizado foi o método do padrão externo (Cassiano *et al.*, 2009). Para cada componente da mistura que se pretende quantificar (ATP, ADP, AMP, ADO, INO, HX), foi elaborada uma curva de calibração (gráfico da área do pico em função da concentração) que deveria possuir um declive linear dentro do intervalo de concentrações esperado para cada composto e intercepar o eixo das ordenadas em zero ou próximo de zero. Pela expressão matemática das retas de calibração ($y=mx+b$) pode determinar-se a concentração de cada composto presente na amostra que é proporcional ao seu sinal analítico (área) desde que os volumes injetados sejam conhecidos com exatidão. Este método requer o controlo estrito da técnica e das condições instrumentais (condições de separação, fluxo da fase móvel, volume de injeção).

Para a obtenção das curvas de calibração de cada purina. ATP, ADP, AMP, HX, INO, ADO, utilizada na quantificação de nucleótidos e nucleósidos de adenina nas cinéticas do catabolismo extracelular do ATP no ML-PM do íleo de ratazana, injetaram-se 25 μ L de soluções padrões dos compostos acima referidos, em concentrações crescentes de 1.9 μ M a 30 μ M, representadas na Figura 15.

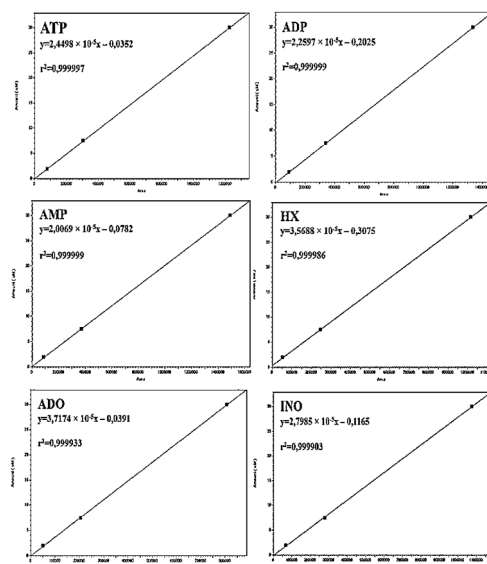


Figura 15 - Curvas de calibração típicas do ATP, ADP, AMP, HX, INO, ADO, utilizadas na quantificação de ATP e metabolitos obtidos a partir das cinéticas do catabolismo extracelular de ATP no PM-LM do íleo de ratazana.

iv. Determinação dos tempos de semi-vida

O tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) de um composto corresponde ao período de tempo necessário para que uma dada quantidade ou concentração desse composto se reduza a metade.

Nos casos em que a cinética é de primeira ordem, a representação gráfica é linear [Log (concentração) = f (tempo)].

A equação da reta é dada pela seguinte equação (Shargel, 1980):

$$\log A = \frac{-kt}{2,3} + \log A_0$$

(A – concentração do composto; $\frac{-k}{2,3}$ - Declive da reta; A_0 – interceção do eixo das ordenadas; t – tempo)

O tempo de semi-vida deduzido desta equação resulta:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

k é uma constante expressa em tempo⁻¹ (-k = declive da reta $\times 2,3$)

v. Determinação da atividade da desidrogenase do lactato (DHL)

Durante a realização das experiências houve cuidado para minimizar a deterioração da preparação ao longo do procedimento experimental.

Para avaliar a integridade celular foi determinada a atividade da DHL, que sendo uma enzima intracelular a sua presença no meio extracelular é indicador de lise celular. A quantificação da atividade da DHL foi efetuada segundo o método descrito por Stolzenbach (1986), cujo princípio é baseado na seguinte reação (Stolzenbach, 1986):

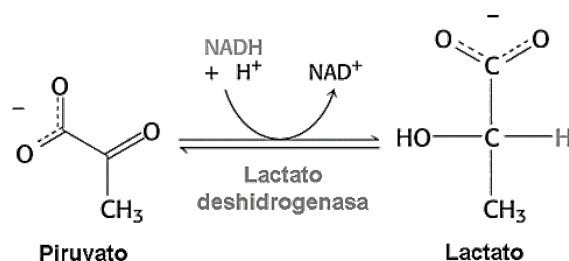


Figura 16 - Esquema representativo da transformação de piruvato em lactato.

Na presença de DHL, o equilíbrio é deslocado no sentido da produção de lactato e NAD⁺. A atividade da DHL (U/mL) é medida pela velocidade de consumo de piruvato e da forma reduzida da NADH; assim, é construída uma reta através da diminuição da absorvância, a 365 nm, devida à oxidação do NADH, em função do tempo. A partir do declive dessa reta, determina-se a atividade da DHL através da expressão:

$$\frac{U}{mL} = \frac{|\text{declive}|}{6,2 \times 10^3} \times 10^3 \times 20$$

O procedimento experimental foi semelhante ao método descrito por Stolzenbach (1986), preparou-se um tampão fosfato (pH = 7,5) a partir de duas soluções: A (50 mM de NaH₂PO₄.H₂O) e B (50 mM de NaH₂PO₄.2H₂O). Este tampão foi suplementado com piruvato de sódio, obtendo-se um tampão fosfato 50 mM contendo 0,6 mM de piruvato. Seguidamente, adicionou-se NADH a esse tampão, numa concentração final de 4,1 mM, deixando-se 15 minutos à temperatura ambiente. A calibração do espectrofotómetro (*Jenway 6305 UV/Vis*) foi feita utilizando a solução tampão de fosfato com piruvato de sódio previamente preparada. A atividade da DHL foi determinada através da diminuição da absorvância em função do tempo (0,5, 1, 2 e 3 min), a um comprimento de onda de 365 nm, após a adição de 200 µL da amostra a 2,5 mL de solução NADH e piruvato em tampão fosfato.

6. Imunofluorescência

i. Fixação dos tecidos

Nas experiências efetuadas com tecidos de animais controlo e diabéticos foi utilizado como fixador uma solução PLP (paraformaldeído 2%, lisina 0.075 M, fosfato de sódio 0.037 M, periodato de sódio 0.01 M). Este fixador é capaz de preservar tanto a ultraestrutura do tecido como a sua antigenicidade (McLean and Nakane, 1974).

As preparações de ML-PM utilizadas foram dissecadas a partir do íleo de ratazana, como descrito anteriormente, estiradas (com a ajuda de alfinetes) em placas de Petri revestidas com Sylgard® e fixadas em solução de PLP durante 16 horas e a 4°C. As preparações foram posteriormente lavadas com uma solução de tampão fosfato 0,1 M em 3 ciclos de 10

minutos; criopreservadas em solução crioprotectora (glicerol anidro 20%, tampão fosfato 0,1 M), durante 16 horas a 4°C, e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

ii. Bloqueio e permeabilização

As preparações de PM-ML foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com um tampão de bloqueio (soro bovino fetal 10%, albumina bovina sérica 1%, Triton X-100 0,5% em PBS) durante 2 horas com agitação constante. Este é um passo fundamental para bloquear ligações não específicas do antisoro primário, diminuindo a possibilidade de ocorrência de *background* (imagens não específicas de fundo) (Figura 17).

O tampão de bloqueio usado possui ainda na sua constituição o detergente Triton X-100, que quando em baixas concentrações aumenta a permeabilidade das membranas biológicas às proteínas, facilitando a penetração dos anticorpos (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

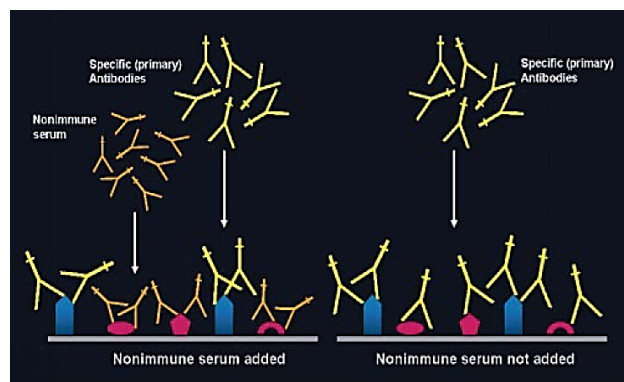


Figura 17 - Bloqueio da ligação inespecífica com o soro normal. O soro normal adicionado antes do anticorpo primário (à esquerda) vai bloquear a ligação inespecífica do antisoro primário. Quando não se procede ao bloqueio (à direita), o anticorpo primário pode ligar-se antígenos não relacionados (as figuras azuis são os antígenos alvo do anticorpo primário) no tecido, levando ao aparecimento de ligações inespecíficas (Adaptado de (Ramos-Vara, 2005)).

iii. Marcação com anticorpos

Um dos conceitos fundamentais da imunohistoquímica é demonstrar a presença de antígenos (Ag) em secções de tecidos por meio de anticorpos (Ac) específicos. As ligações Ag – Ac podem ser evidenciadas quer através de reações histoquímicas colorimétricas que podem ser visualizadas com um microscópio convencional, quer através

de fluorocromos podendo ser visualizadas com um microscópio de epifluorescência ou confocal.

No trabalho desenvolvido, a técnica de imunofluorescência aplicada envolveu uma marcação indireta, isto é, dois conjuntos de anticorpos: um anticorpo primário, aplicado contra o antigénio de interesse; e um segundo anticorpo, acoplado a um fluoróforo, que reconhece o anticorpo primário.

a) Marcação com anticorpos primários

Depois de bloqueadas e permeabilizadas, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários escolhidos (Ver quadro 7) diluídos em tampão de incubação (soro bovino fetal 5%, albumina sérica 1%, Triton X-100 0,5% em PBS), a 4°C durante 16 horas. Como o protocolo corresponde a uma marcação dupla, os anticorpos foram combinados antes de serem aplicados nas amostras, isto é, aquando a sua diluição no tampão de incubação.

Quadro 7 - Detalhes dos anticorpos utilizados.

Antigénio	Código	Hospedeiro	Diluição	Fonte
Anti-NTPDase 2	BZ1-5F	Coelho (rb)	1/400	Cedido por Jean Sévigny (Univ.Laval. CAN)
Anti-NTPDase 3	rN3-1 _L I ₅	Coelho (rb)	1/400	Cedido por Jean Sévigny (Univ.Laval. CAN)
Anti-5'-Nucleotidase	rNU-9I ₅	Porquinho-da-Índia (gp)	1/1350	Cedido por Jean Sévigny (Univ.Laval. CAN)
Produto da proteína gene 9.5 (PGP 9.5)	7863-1004	Ratinho (ms)	1/600	Serotec
Sintetase neuronal do monóxido de azoto (nNOS)	ab1376	Cabra (gt)	1/300	Abcam
Transportador vesicular de ACh (VACHT)	AB1588	Porquinho-da-Índia (gp)	1/600	Abcam
Recetor A ₁	Ab75177	Coelho (rb)	1/100	Abcam
Recetor A _{2A}	A2aR21-A	Coelho (rb)	1/100	AlphaDiagnostic
Anoctamina 1 (ANO-1)	Ab53212	Coelho (rb)	1/100	Abcam

Após o período de incubação com os anticorpos descritos no quadro anterior, procedeu-se à lavagem das amostras com PM-ML com uma solução de PBS 1%, em 3 ciclos de 10 minutos, preparando as amostras para a marcação com os anticorpos secundários.

b) Marcação com anticorpos secundários

Assim que a lavagem dos anticorpos primários foi concluída, as amostras foram incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes.

Os anticorpos secundários escolhidos (ver Quadro 8) foram diluídos no tampão de incubação já referido e incubados nas amostras durante duas horas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Deve garantir-se que todo o processo após a adição destes anticorpos é efetuado na ausência de luz para evitar a excitação dos fluorocromos.

Quadro 8 - Detalhes dos anticorpos secundários utilizados.

Antígeno	Código	Hospedeiro	IgG anti -	Diluição	Fonte
Alexa Fluor 488 anti-rb	A-21206	Burro	Coelho (anti-rb)	1/1000	Molecular probes
Alexa Fluor 568 anti-ms	A-10037	Burro	Ratinho (anti-ms)	1/1000	Molecular probes
Dylight 649 anti-gp	706-495-148	Burro	Porquinho-da-índia (anti-gp)	1/100	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 568 anti-gt	A-11057	Burro	Cabra (anti-gt)	1/1000	Molecular probes

Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras de PM-ML foram submetidas a novo período de lavagem com solução de PBS 1x, em três ciclos de 10 minutos.

Após conclusão desta etapa as amostras foram montadas em lâminas de vidro em meio de montagem VectaShield e cobertas com lamelas.

Para além destas experiências, fizeram-se também controlos de especificidade (controlos negativos) por omissão dos anticorpos primários da solução de reação.

iv. Microscopia Confocal

As lâminas de vidro, montadas no final da técnica de imunofluorescência, foram examinadas com um microscópio confocal de varrimento por laser (Olympus FluoView FV1000, Japan). As imagens obtidas foram, posteriormente, tratadas usando o software associado ao microscópio, o Olympus Fluoview 4.2 Softwares usando os seguintes lasers: Ar-Ion, que emite na gama dos 488 nm e que, portanto, excita o fluoróforo Alexa Fluor 488; um laser de He-Ne, que emite no comprimento de onda de 543 nm e que vai excitar o fluoróforo Alexa Fluor 568 e um laser He-Ne, que emite no comprimento de onda de 633 nm e que vai excitar o fluoróforo 649. As amostras do tecido foram sujeitas a um varrimento sequencial, sendo que em alguns casos foram adquiridas imagens em vários planos (Z-stack).



Figura 18 - Microscópio confocal Olympus FV 1000 (Olympus, Japão) usado para visualização das imagens da PM-LM marcadas com anticorpos.

7. Libertação de ACh-[³H]

Os procedimentos utilizados para a preparação dos tecidos de ML-PM na libertação de ACh-[³H] foram descritos anteriormente. O protocolo aplicado foi proposto por Correia-de-Sá e colaboradores (Correia-de-Sa *et al.*, 1991) com algumas modificações (Duarte-Araújo *et al.*, 2004) (ver Figura 19).

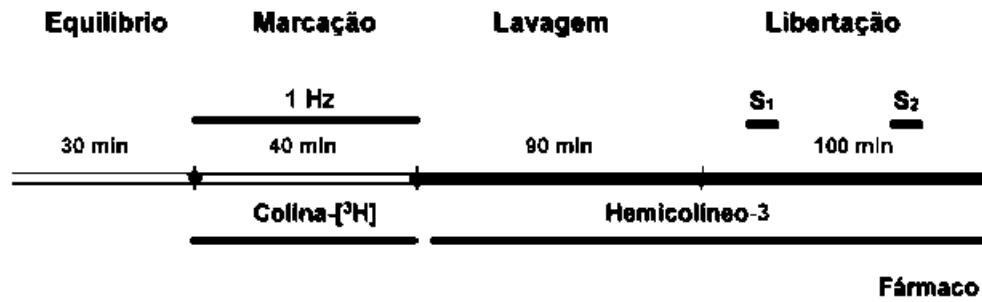


Figura 19 - Representação esquemática do protocolo utilizado para a quantificação da acetilcolina tritiada libertada a partir do plexo mioentérico de íleo de ratazana.

As preparações de ML-PM foram montadas entre dois elétrodos de prata e colocadas em banhos de órgãos verticais, com cerca de 2,5 mL de capacidade. A perfusão das preparações com a solução de Tyrode oxigenada foi assegurada pela utilização de uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls3). A temperatura de 37°C foi mantida constante durante todo o procedimento experimental através da circulação de água pelo compartimento exterior à câmara de perfusão. Esta água foi bombeada a partir de um banho termostatzado que serviu também para o aquecimento das soluções utilizadas na perfusão. As soluções foram mantidas em agitação constante através do arejamento com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%). Ver imagem da bancada onde se realizaram as experiências de libertação de ACh-[³H] (Figura 20).

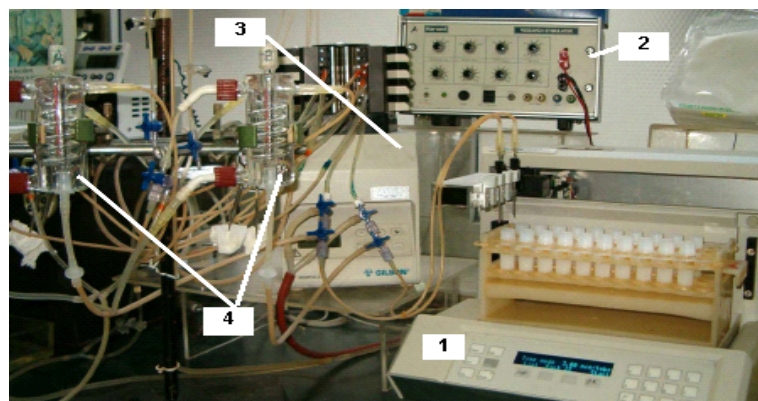


Figura 20 - Bancada de experiências de libertação de ACh-[³H]: 1- Coletor de frações pré-programado (Gilson, FC 203B); 2- Estimulador; 3- Bomba peristáltica (Gilson, Minipuls3); 4- Banho de órgãos vertical.

i. Período de Equilíbrio

Após a montagem segue-se o período de equilíbrio, em que a solução de Tyrode foi mantida em perfusão durante 30 minutos, para garantir o equilíbrio e a remoção de resíduos que resultem da disseção das preparações do ML-PM.

ii. Período de Marcação

Após o período de equilíbrio a perfusão foi interrompida e as preparações foram incubadas durante 40 minutos com uma solução de Tyrode contendo 1 mM de metil-[³H]-colina (atividade específica de 2,5 µCi nmol⁻¹).

Durante o período de marcação as preparações foram estimuladas eletricamente 40 minutos a 1 Hz por intermédio de um estimulador SD9 (Grass Instruments, U.S.A). Os estímulos gerados foram aplicados através de dois elétrodo de prata colocados nas extremidades das câmaras onde se encontram as preparações (estimulação elétrica de campo - EEC). Estas condições favorecem a exaustão das reservas de acetilcolina (ACh) endógena e a sua substituição por acetilcolina tritiada (ACh-[³H]) sintetizada de novo.

iii. Período de Lavagem

Após terminado o período de marcação, a estimulação elétrica foi interrompida e as preparações foram de novo perfundidas (15 mL min) com uma solução de Tyrode contendo hemicolinio-3 (10 µM), um inibidor da recaptção de colina com elevada afinidade para o transportador de colina dependente de Na⁺. Este inibidor utilizado após o período de marcação impede a síntese de novas moléculas de ACh não marcadas radioativamente, evitando assim o erro na determinação da quantidade total de acetilcolina. Após lavagem das preparações para retirar o excesso de radioatividade não incorporada nas terminações nervosas, suspendeu-se a perfusão e deu-se início ao período de libertação.

iv. Período de libertação

A perfusão foi novamente interrompida, sendo este considerado o “tempo zero” do período de libertação. Seguiu-se a recolha de 2,5 ml da solução de incubação de 3 em 3 minutos por esvaziamento completo e reenchimento com a solução em uso. Este procedimento

foi inteiramente automatizado e executado por um coletor de frações pré-programado (Gilson, FC 203B) ligado a uma bomba peristáltica (Gilson, Miniplus3).

A liberação de ACh-[³H] foi induzida por EEC, utilizando 200 pulsos monofásicos retangulares de 1 ms de duração, aplicados com uma frequência de 5 Hz. Realizaram-se dois períodos de estimulação, aos 12 (S1) e 39 (S2) minutos após o início do período de liberação (Figura 19). O cálculo da liberação de ACh-[³H] induzida por EEC foi obtido por subtração do efluxo basal de trítio ao efluxo total durante cada período de estimulação.

A liberação de ACh-[³H] a partir das terminações nervosas do plexo mioentérico resulta de um fenómeno de natureza exocitótica, já que foi prevenido na ausência de cálcio extracelular ($\text{Ca}^{2+}\emptyset$) juntamente com um quelante do mesmo (EGTA, 1 mM) e na presença de tetrodoxina (TTX, 1 μM), uma neurotoxina que bloqueia a geração do potencial de ação nervoso (Duarte-Araujo *et al.*, 2004).

v. Quantificação de ACh-[³H]

A quantificação da liberação de ACh-[³H] foi realizada em amostras de 400 μl da solução de incubação recolhida pelo coletor de frações de 3 em 3 minutos, às quais foi adicionado 3.5 ml de líquido de cintilação (Insta-Gel Plus, PerkinElmer). A quantidade de radioatividade por amostra foi determinada por espectrometria de cintilometria líquida após subtração do valor basal (branco), que nunca excedeu 5% da radioatividade total das amostras. A percentagem de eficiência do contador de cintilações (PERKIN ELMER, Tri-Carb 2900TR) para o trítio era de $40\pm 2\%$.

Após a experiência foi determinado o peso seco do tecido que permitiu a expressão da radioatividade em desintegrações por minuto (DPM) por grama de tecido. As preparações foram pesadas e imersas (durante a noite à temperatura ambiente) em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para determinar o conteúdo em trítio incorporado pelas preparações. Após os períodos de marcação e de lavagem, as preparações continham $(10648 \pm 324) \times 10^3$ dpm/g, e o valor do efluxo basal de trítio era de $(115 \pm 18) \times 10^3$ dpm/g nos primeiros 3 minutos do período de liberação (n=8). A liberação fracionada de trítio na primeira amostra foi de $1.08 \pm 0.14\%$ da radioatividade total presente no tecido no início do período de liberação.

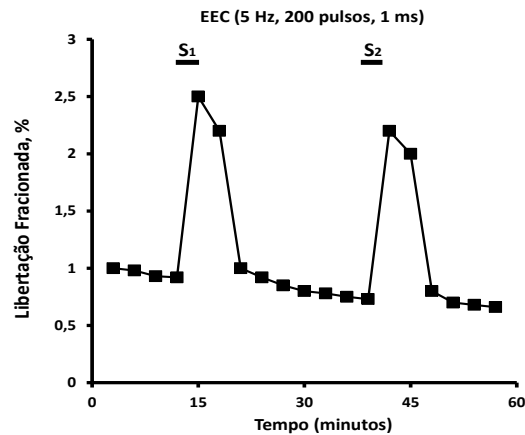


Figura 21 - Gráfico representativo da liberação de ACh-[3H] a partir do plexo mioentérico de íleo de ratazana. Os níveis de trítio (nas ordenadas) são expressos pela percentagem da radioatividade total presente no tecido no início do período de colheita. O eixo das abcissas indica o tempo em que as amostras foram colhidas. A liberação de ACh-[3H] foi induzida por estimulação elétrica de campo (EEC), utilizando 200 pulsos de 1ms de duração, aplicados com uma frequência de 5 Hz. Este período de estimulação foi aplicado duas vezes ao longo da experiência, aos 12 (S1) e aos 39 (S2) minutos após o fim do período de lavagem (tempo 0). (Adaptado de (Duarte-Araujo *et al.*, 2004).

vi. Efeito dos fármacos e interações farmacológicas

Todos os fármacos testados foram aplicados às soluções de incubação 15 minutos antes do segundo estímulo e mantiveram-se presentes até o fim de cada experiência. O efeito dos fármacos foi avaliado pelas razões entre S2/S1, i.e. as razões entre a liberação induzida de ACh-[³H] calculada durante o segundo período (S2) de estimulação (na presença do fármaco) e a calculada durante o primeiro período (S1) de estimulação (na ausência do fármaco). Os valores expressos em percentagem correspondem à variação percentual das razões S2/S1 quando comparadas com a razão S2/S1 obtida nas experiências controlo. Zero por cento indica uma igualdade entre as razões; valores positivos e negativos significam facilitação ou inibição, respetivamente, da liberação induzida de ACh-[³H].

8. Fármacos

O ADP, AMP, ATP, dextrano, fosfato de sódio, glicerol anidro, HX, inosina (INO), lisina, MnCl₂, paraformaldeído (prills), Pb(NO₃)₂, cloreto de colina, soro de bovino fetal, acetilcolina, o STZ, a R-PIA, o NBTI, mibefradil, o dipiridamol e o tampão citrato foram obtidos pela Sigma (St. Louis, MO, USA). A oubaína foi adquirida à Vaz Pereira (Lisboa, Portugal)

O CGS 21680, o TTX, e o EHNA foram adquiridos à Tocris e o NaCl, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , [metil- ^3H] cloreto de colina (solução de etanol, 80.6 Ci mM) o soro de albumina e o Triton X-100 à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os restantes fármacos foram preparados em água destilada. As soluções de inibidores e substratos foram congeladas em alíquotas, a -20°C e nunca foram sujeitas a mais de um ciclo de congelação/descongelação antes de serem usadas. Diariamente foram preparadas diluições destas soluções em Tyrode e executadas experiências para controlar o efeito dos solventes. O pH das soluções utilizadas não variou significativamente pela adição dos fármacos na concentração máxima utilizada aplicada às preparações.

IV. RESULTADOS

1. Validação do modelo STZ em ratas

Com o objetivo de validar o modelo de DM tipo 1 selecionado, as ratas macho injetadas com 55 mg/kg de (STZ) por via i.p. foram acompanhadas durante 14 dias, correspondente ao período de indução da diabetes. Ao longo deste período a taxa de sobrevivência dos animais injetados com STZ foi de 100% e a taxa de eficácia (% de animais que desenvolveu diabetes) verificada foi superior a 95%. Os animais injetados com STZ apresentavam sinais característicos de diabetes tipo 1 : polidipsia, poliúria e polifagia, que se acentuava na segunda semana após a indução. Assim, considerando o bem-estar destes animais, as caixas onde se encontravam alojados (grupos de 2 animais por caixa) deixaram de ser mudadas semanalmente (como as dos CTRL) e passaram a ser mudadas diariamente, sendo a água e a comida repostas com a mesma frequência. Os animais diabéticos apresentavam-se de forma geral menos reativos que os controlo e era frequente encontrar fezes amareladas de consistência pastosa nas caixas. Parâmetros como o peso dos animais, o consumo de água e comida, e o perfil glicémico foram comparados entre o grupo de animais controlo (CTRL) e diabético (STZ), emparelhados em idade.

Podemos observar na Figura 22 que os animais STZ apresentaram um consumo de comida superior (**** $P < 0,0001$, $n=6$) aos animais CTRL, i.e. os animais diabéticos consomem em média 42 ± 7 gr/dia de comida um valor muito superior aos 22 ± 2 gr/dia consumido pelos animais do grupo controlo (Figura 22 A e B). Quanto ao consumo de água, concluiu-se que os animais STZ (210 ± 26 mL/dia) apresentavam um consumo significativamente superior (**** $P < 0,0001$, $n=6$) ao dos animais CTRL (30 ± 3 mL/dia) (Figura 22 C e D).

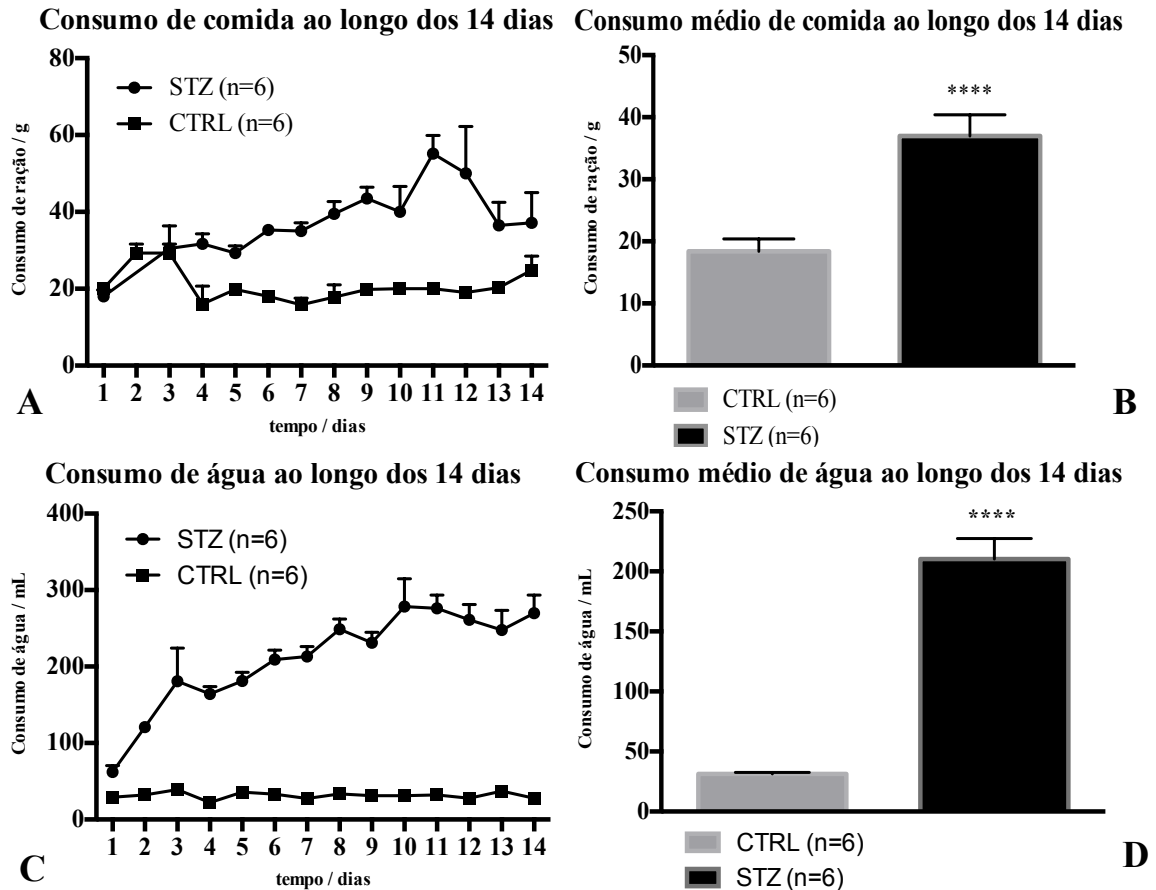


Figura 22 - Representação gráfica do consumo de comida e água de animais CTRL e STZ durante 14 dias. (A): consumo diário de ração; (B) consumo médio de ração; (C): consumo diário de água e (D) consumo médio de água. Média \pm SEM. **** $P < 0,0001$, $n = 6$.

Para além destes parâmetros, comparou-se ainda a evolução do peso e da glicemia em animais CTRL e STZ (Figura 23). Foram considerados diabéticos todos os animais com valores de glicemia superiores a 250 mg/dL 48 horas após administração do STZ. Para serem incluídos no grupo diabético STZ, os animais tinham que apresentar valores de glicose sanguínea acima dos 300 mg/dL (King, 2012) a partir do 3º dia até ao final do ensaio.

Apesar do aumento do consumo de água e alimento, os animais STZ apresentaram perda ponderal durante todo o ensaio comparativamente aos animais do grupo controlo, que foi mais acentuada durante a 1ª semana (Figura 23 A). Os animais STZ apresentaram uma perda média diária de peso de 4 ± 3 gr/dia (* $P < 0,05$ $n = 6$), contrastando com o ganho médio diário de peso de $1,5 \pm 0,6$ gr/dia observado nas ratas de controlo ($n = 6$).

Os animais injetados com STZ apresentaram valores de glicemia acima dos 300 mg/dL (****P<0,0001, n=48,) 48 horas após a indução da diabetes, mantendo em média valores superiores a 400 mg/dL (****P<0,0001, n=48) até ao 14º dia (Figura 23 B). Durante todo o estudo os animais CTRL avaliados apresentaram valores médios da glicemia aproximadamente de 107±7 mg/dL (n=6).

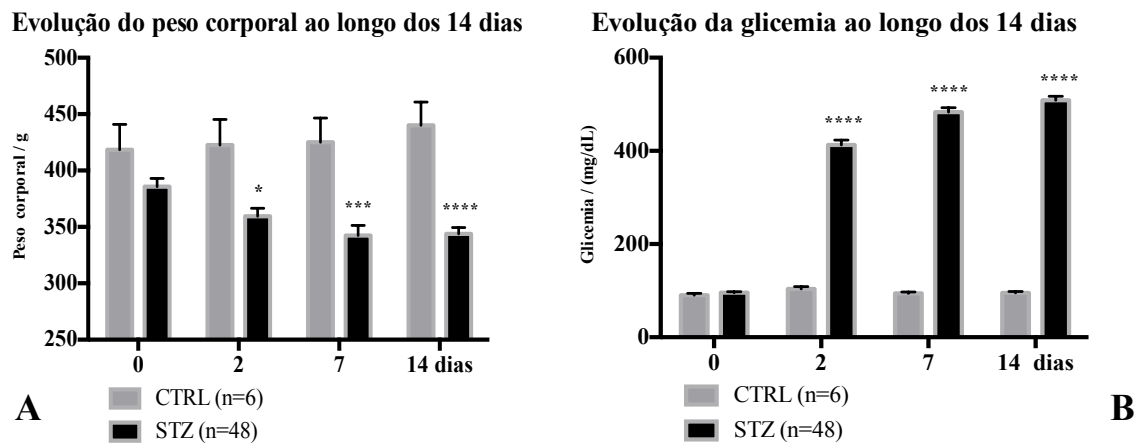


Figura 23 - Gráficos da evolução do peso e da glicemia em animais CTRL e STZ nos 14 dias seguintes à indução com STZ. (A) Gráfico da evolução do peso e (B) Gráfico da evolução da glicemia. Média ±SEM. *P<0,05, **P<0,01****P<0,0001, n= 6-48.

Estes resultados sugerem que o modelo de diabetes tipo 1 induzido pela administração de STZ foi implementado com sucesso e pode ser utilizado ao 14º dia, o dia escolhido para os restantes protocolos experimentais.

2. Avaliação da motilidade gastrointestinal e caracterização morfológica do íleo

A motilidade gastrointestinal nos animais diabéticos STZ foi avaliada *in vivo*, quantificando a progressão de uma solução aquosa (10%) de azul-de-metileno ao longo do tubo digestivo durante 30 minutos (Figura 24). A distância percorrida pelo corante foi normalizada pelo comprimento total do intestino delgado. Nos animais STZ, o corante percorreu apenas 57±3 cm dos 140±3 cm de intestino delgado (41,09±2,01%, n=9), um valor inferior à distância percorrida pelo azul-de-metileno nos animais controlo (73±3cm dos 126±4 cm de intestino delgado) correspondente a uma percentagem de 57,41±1,16% (n=7) no mesmo intervalo de tempo (Figura 24). Verifica-se, assim, que a motilidade

gastrointestinal é significativamente ($***P<0,001$, $n=7-9$) mais lenta nos animais diabéticos.

% do intestino delgado percorrido pelo AM

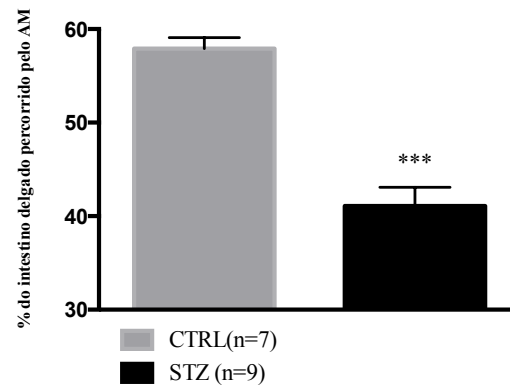


Figura 24 - Avaliação da motilidade gastrointestinal em animais CTRL e STZ. Gráfico representativo da porcentagem do intestino delgado que foi percorrida pelo corante azul-de-metileno. Média \pm SEM. $***P<0,001$, $n=7-9$.

Após a eutanásia e a realização da laparotomia mediana, avaliou-se o aspecto geral e a dimensão dos órgãos do aparelho GI nos animais CTRL e STZ (Figura 25). Quanto ao aspecto geral da cavidade abdominal é de salientar a quase inexistência de tecido adiposo e as elevadas dimensões do cego e intestinos dos animais STZ.

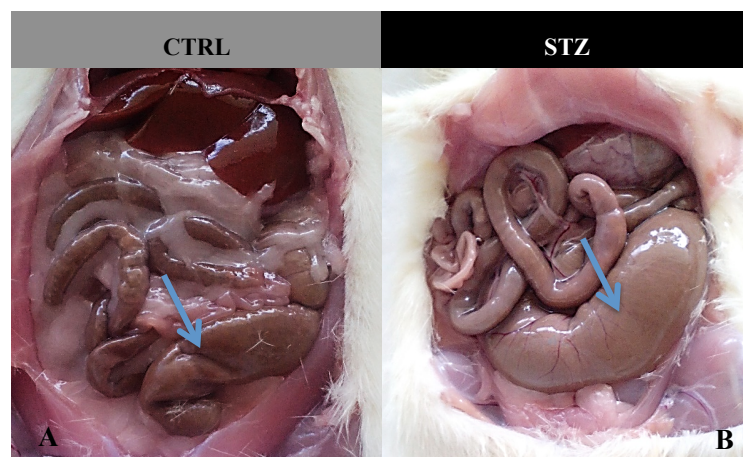


Figura 25 - Avaliação morfológica da cavidade abdominal de animais CTRL e STZ. (A) - animal CTRL (A) e (B) - animal STZ, com evidente aumento do tamanho do cego (setas azuis) e redução da gordura mesentérica.

Considerando as alterações morfológicas observadas (Figura 25) foi efetuada a pesagem do cego e do íleo (“a fresco” e a “seco”). A Figura 26 representa a avaliação dos pesos do cego e do íleo dos animais STZ comparativamente aos animais CTRL. Os cegos utilizados foram pesados logo após a sua remoção e o seu peso foi normalizado para o comprimento (cm) da tíbia do respetivo animal. Verificamos que, embora a medida da tíbia seja idêntica entre animais CTRL ($3,99 \pm 0,06$ cm, $n=19$) e STZ ($4,20 \pm 0,03$ cm, $n=48$), existe um aumento muito significativo ($****P<0,0001$) do peso do cego em animais STZ (19 ± 1 gr, $n=48$) comparativamente com os CTRL (8 ± 1 gr, $n=19$) (Figura 26 A).

Sabendo que o cego dos animais STZ pesava mais que o dos CTRL, decidi pesar-se também os íleos destes animais. Observou-se que o peso dos fragmentos de íleo (1 cm de comprimento) variava se a pesagem fosse feita “a fresco” ou “a seco” (Figura 26 B). O peso do íleo fresco nos animais STZ foi de 88 ± 9 mg ($n=8$), um valor significativamente ($*P<0,05$) superior ao peso de íleo dos animais CTRL (70 ± 3 mg, $n=8$). Contudo essa diferença deixa de ser evidente após a secagem dos tecidos durante 48 horas.

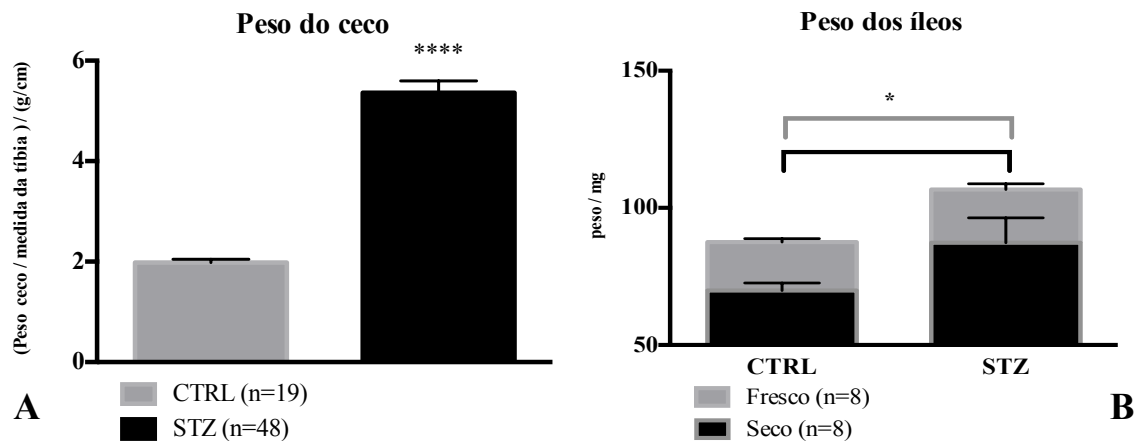


Figura 26 - Avaliação do peso do ceco e do íleo de animais CTRL vs STZ. (A) Gráfico com o peso do ceco normalizado para comprimento da tíbia e (B) gráfico com o peso de 1 cm de íleo fresco e seco dos animais CTRL vs STZ. Média \pm SEM. $*P<0,05$, $****P<0,0001$.

Estes resultados sugerem que no modelo STZ a motilidade GI está comprometida, sendo acompanhada por uma aumento das dimensões (comprimento, volume e peso) do cego e do íleo “a fresco”. Pode ainda concluir-se que o aumento das dimensões do íleo reflete um aumento do teor em água (edema) do tecido que desaparece após secagem do mesmo.

3. Avaliação da contração muscular isométrica do íleo de animais controlo e diabéticos

Considerando as alterações morfológicas e a diminuição da motilidade intestinal observadas nos animais STZ, decidimos avaliar a atividade espontânea e induzida pela ACh em preparações isoladas de íleo sem qualquer tipo de inervação autonómica.

Na Figura 27 está representado um traçado típico das contrações espontâneas do íleo de ratas CTRL e STZ. É possível observar que no traçado do animal diabético predomina um padrão de contrações espontâneas de elevada amplitude com perda das oscilações cíclicas entre contrações de elevada e baixa amplitude, característica do íleo dos animais controlo.

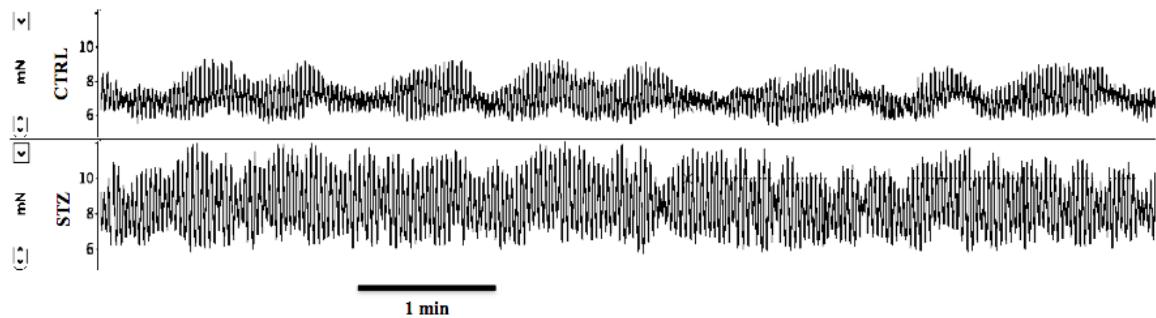


Figura 27 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea obtida a partir de um fragmento de íleo (1cm) de um animal CTRL (registo superior) e de um animal STZ (registo inferior).

A representação gráfica das alterações observadas nas contrações espontâneas de animais CTRL e STZ está representada na Figura 28. Neste contexto, foi possível observar que a amplitude média das contrações normalizada para o peso seco da preparação (em mN/mg) foi significativamente (* $P < 0.05$) maior nos animais STZ (0.18 ± 0.04 mN/mg) que nos CTRL (0.09 ± 0.03 mN/mg) (Figura 28 B). Existe uma tendência (embora sem significado estatístico, $P > 0.05$) para que a frequência (em Hz) das contrações espontâneas seja menor nos animais STZ (0.35 ± 0.04 Hz) que nos CTRL (0.42 ± 0.06 Hz) (Figura 28 A).

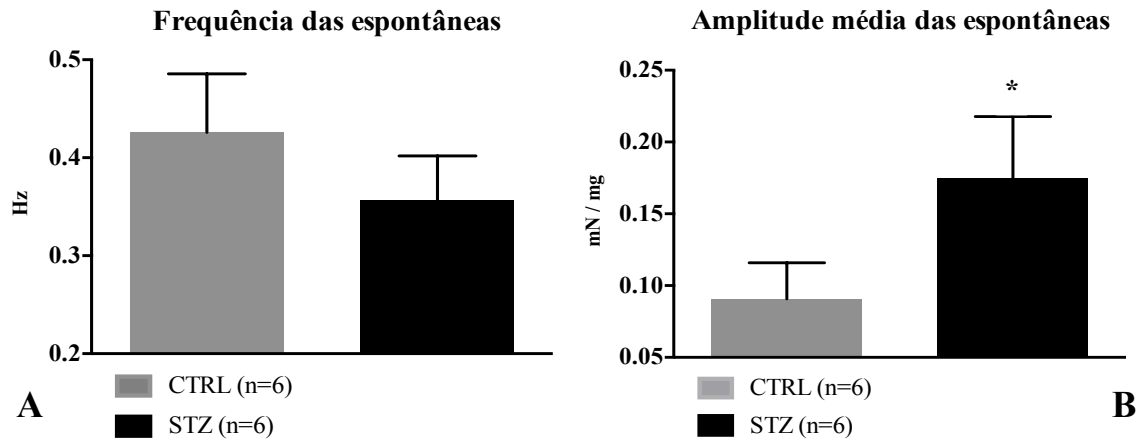


Figura 28 - Comparação da frequência (A) e amplitude média (B) das contrações espontâneas registradas durante o período de incubação em animais CTRL e STZ. Média±SEM, *P<0,05.

Para compreender se as alterações observadas nas contrações espontâneas do íleo de animais diabéticos estão relacionadas com modificações nas células marca-passo ICC e/ou em circuitos neuronais intrínsecos, efetuaram-se experiências na presença de mibefradil (3 μ M) e tetrodotoxina (TTX, 1 μ M). O mibefradil bloqueia canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo T (Cav3), característicos das ICC (De Ponti *et al.*, 1989, Leuranguer *et al.*, 2001). A TTX (Lee and Ruben, 2008) é uma neurotoxina que bloqueia os canais de sódio dependentes da voltagem das membranas das células nervosas, impedindo a propagação do impulso nervoso.

Nas Figuras 29 e 31 estão representados traçados originais onde é possível observar as alterações na frequência e na amplitude das contrações espontâneas do íleo de animais CTRL e STZ, antes e após a aplicação de mibefradil (Figura 29) e de TTX (Figura 31).

Na Figura 29 verifica-se a existência de uma diminuição da amplitude das contrações espontâneas após a incubação do íleo de animais CTRL e STZ com mibefradil (3 μ M).

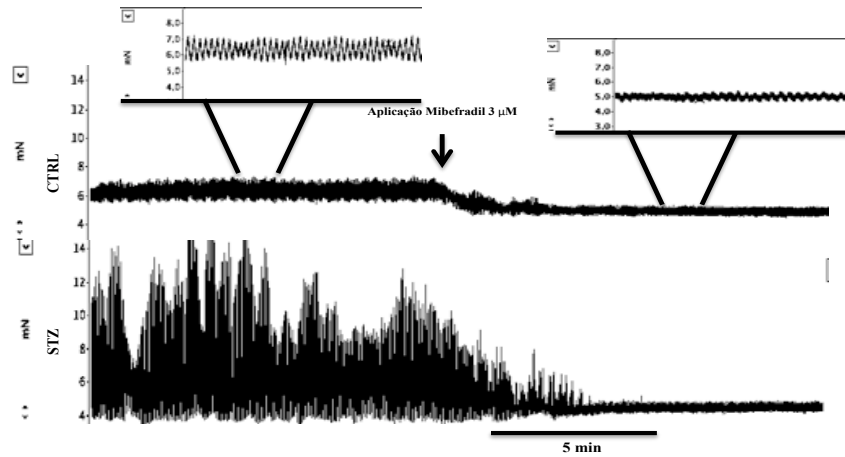


Figura 29 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea obtida a partir de animais CTRL (registo superior) e STZ (registo inferior) antes e após a administração de mibefradil (3 μ M).

O gráfico da Figura 30 A mostram que nos animais CTRL o mibefradil (3 μ M) causou uma inibição da frequência das contrações espontâneas (-32 ± 9 % Δ basal) que não se verificou nas ratas STZ (1 ± 17 % Δ basal). Do mesmo modo, observou-se que a tensão basal das contrações espontâneas foi mais afetada pelo mibefradil (3 μ M) nos animais CTRL (-36 ± 9 % Δ basal) do que nos STZ (-10 ± 5 % Δ basal) (Figura 30 C) Quanto à amplitude média (Figura 30 B), o mibefradil (3 μ M) reduziu de forma clara e praticamente equivalente a força das contrações espontâneas tanto em animais CTRL (-69 ± 9 % Δ basal) como em STZ (-80 ± 5 % Δ basal).

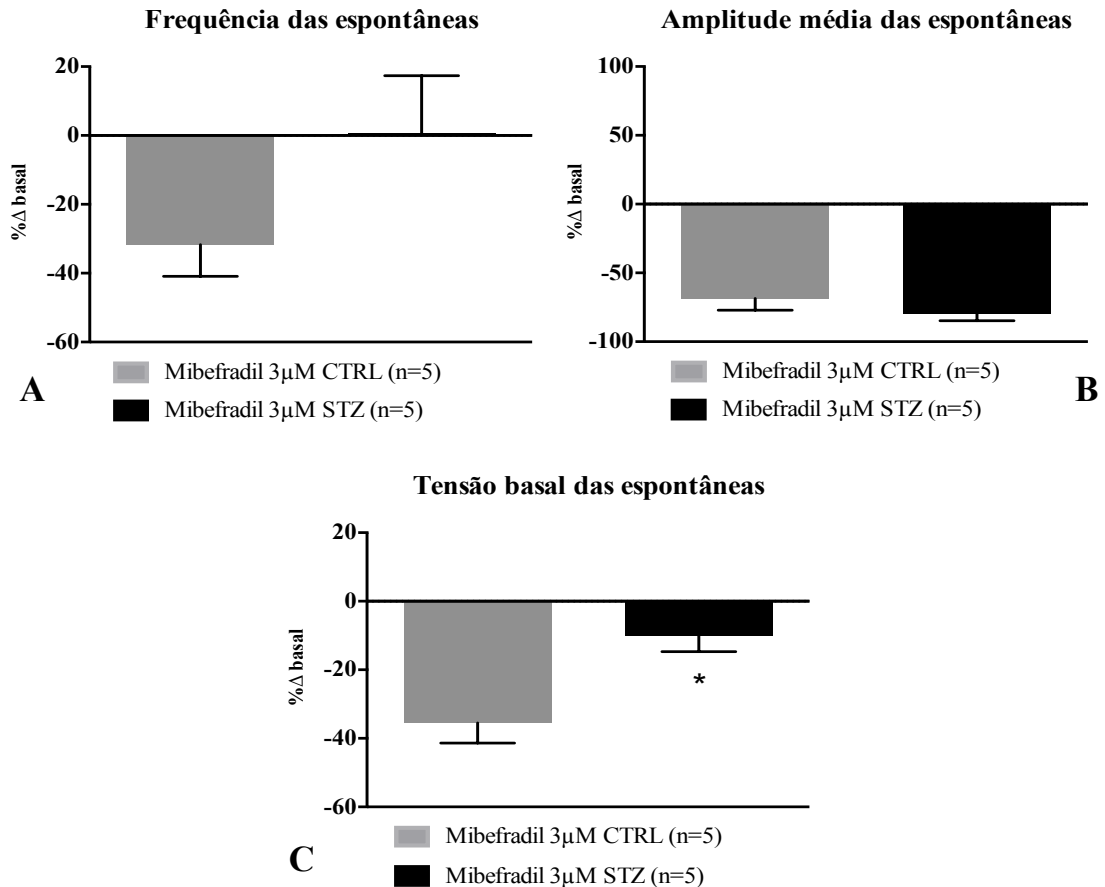


Figura 30 - Comparação da frequência (A), amplitude média (B) e tensão basal (C) das contrações espontâneas, registadas após a aplicação de mibefradil (3 μM), em animais CTRL e STZ. Média±SEM, *P<0,05.

Quanto ao traçado representativo da experiência efetuada na presença da TTX (Figura 31), aplicada numa concentração (1 μM) suficiente para prevenir a libertação de neurotransmissores pelos nervos mioentéricos (Duarte-Araujo *et al.*, 2004), os resultados parecem indicar que uma ausência do envolvimento de circuitos neuronais intrínsecos do intestino sensíveis à TTX na atividade espontânea do íleo tanto em animais CTRL como STZ.

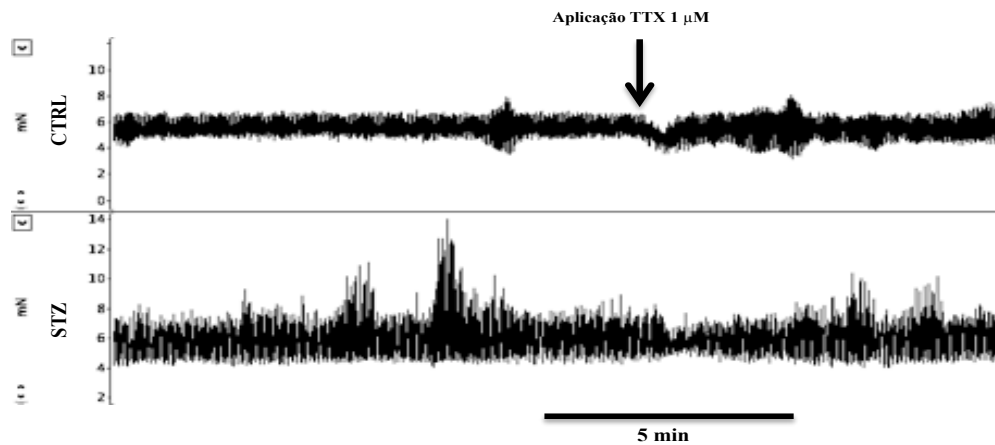


Figura 31 - Registo miográfico típico da contração muscular espontânea obtida a partir de um animal CTRL (registo superior) e de um animal STZ (registo inferior) antes e após a administração de TTX (1 μ M).

Na representação gráfica da Figura 32 pode observar-se que a TTX não alterou significativamente nenhum dos parâmetros avaliados, i.e. frequência (CTRL= $2 \pm 1\% \Delta$ basal e STZ= $8 \pm 5\% \Delta$ basal), amplitude média (CTRL= $46 \pm 46\% \Delta$ basal e STZ= $-5 \pm 11\% \Delta$ basal) e tensão basal tanto em animais CTRL ($-4 \pm 3\% \Delta$ basal) como em animais STZ ($-2 \pm 5\% \Delta$ basal).

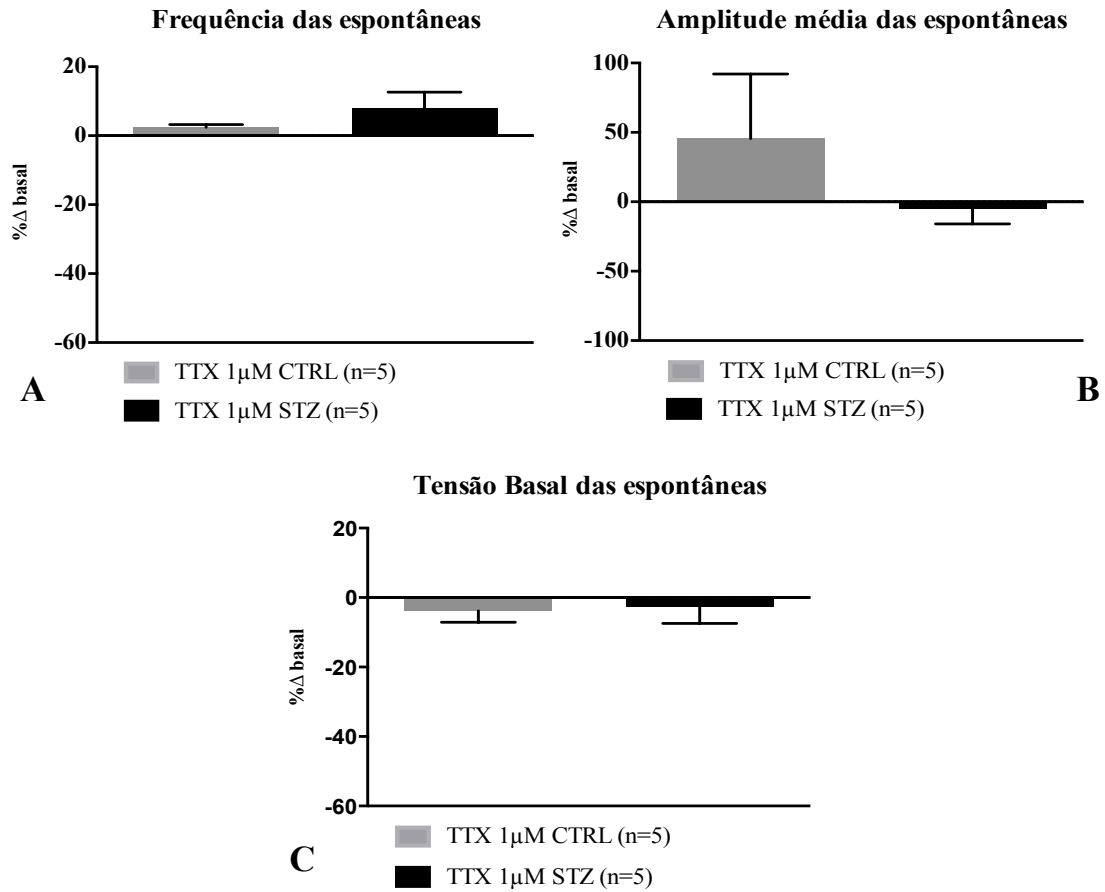


Figura 32 - Gráficos com a comparação da frequência (A), amplitude média (B) e tensão basal (C) das contrações espontâneas, registadas após a aplicação de TTX 1 μM, entre animais CTRL e STZ. Média±SEM.

Sabendo que a acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório do SNE, sendo responsável pela contração do músculo liso intestinal (Burnstock *et al.*, 1970, Duarte-Araujo *et al.*, 2004), foram realizadas experiências para investigar diferenças na sensibilidade da musculatura lisa a este neurotransmissor no íleo de animais CTRL e STZ (Figura 33).

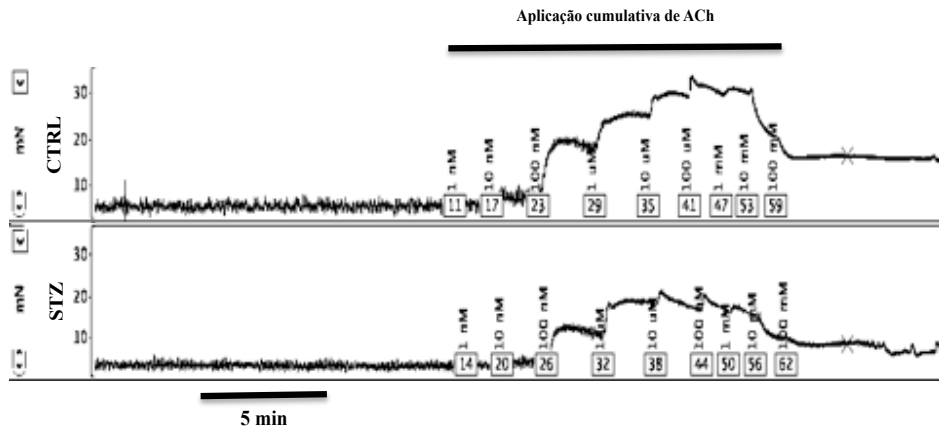


Figura 33 - Registo miográfico da contração muscular induzida pela ACh (1 nM – 10 mM, aplicação cumulativa) em animais CTRL (registo superior) e STZ (registo inferior).

A aplicação cumulativa de ACh (1 nM a 10 mM) produz uma resposta contráctil de menor amplitude máxima no íleo de animais STZ ($1,2 \pm 0,3$ mN/mg) do que nos animais CTRL ($0,8 \pm 0,1$ mN/mg) (Figura 34). A falta de normalização da resposta máxima (por exemplo, com outro agente despolarizante como o KCl) em ambos os tecidos impede uma análise mais profunda dos resultados. No entanto, é possível que as alterações morfológicas e funcionais do íleo dos animais diabéticos tenham alguma repercussão na sensibilidade do músculo liso ao agente contraturante mais importante do tubo digestivo, a ACh.

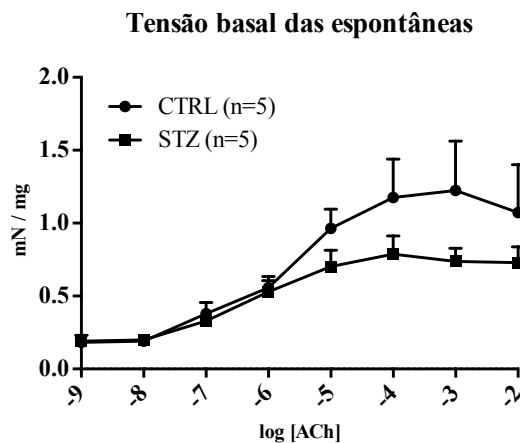


Figura 34 - Comparação da amplitude mínima das contrações espontâneas registada após a aplicação de doses cumulativas de ACh (1 nM a 10 mM), entre animais CTRL e STZ, Média±SEM.

4. Avaliação da perda neuronal e de ICC em animais diabéticos

A perda de células marca-passo ICC foi observada no cólon em modelos de longa duração da diabetes e em animais STZ com 4-8 semanas de evolução (Forrest *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2009). Também se observou a perda de neurónios em animais STZ (4-8 semanas), em particular uma diminuição da imunorreatividade para a nNOS nos corpos celulares dos neurónios nitrérgicos (Anitha *et al.*, 2006, Nezami and Srinivasan, 2010, Watkins *et al.*, 2000, Yarandi and Srinivasan, 2014), sem contudo se ter observado uma perda significativa de neurónios colinérgicos. Neste contexto, decidimos recorrer à imunofluorescência associada à microscopia confocal para avaliar se estas alterações também se verificam no ML-PM de animais STZ com apenas 14 dias de evolução.

Pela análise das imagens da Figura 35 podemos observar que a imunorreatividade do marcador inespecífico de neurónios, PGP (Produto da proteína gene 9.5) (Chalazonitis *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2012) parece estar diminuída nos animais diabéticos. Quanto à marcação com nNOS (sintase do monóxido de azoto neuronal) parece evidente a redução desta marcação, quer no plano ganglionar quer no plano muscular dos animais STZ. Observa-se ainda que nos animais CTRL a colocalização entre os dois anticorpos estudados é evidente (indicada pela cor amarelada da fusão do verde com o vermelho), sendo muito mais difícil encontrar fenómenos equivalentes nos animais STZ.

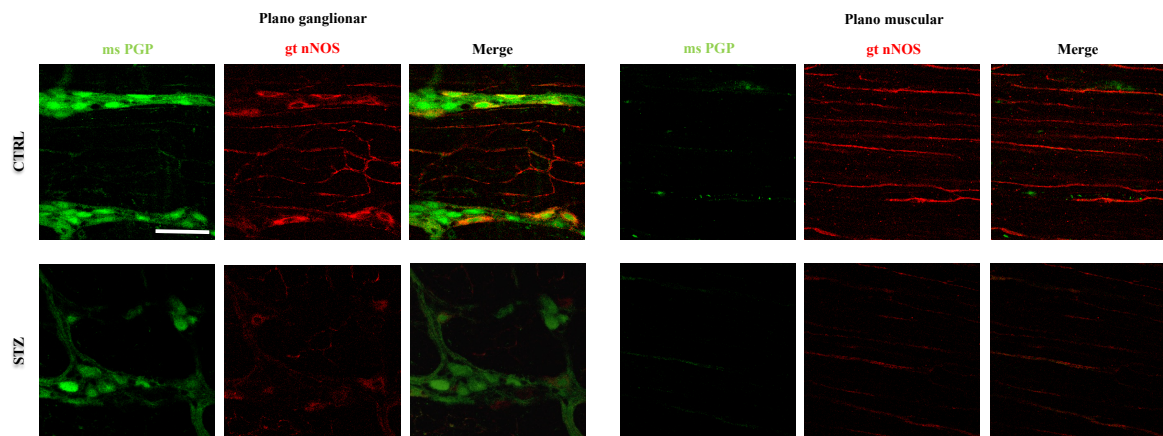


Figura 35 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação dupla de ms PGP (verde) com gt nNOS (vermelho). Escala = 50µm.

Na Figura 36 podemos observar que a imunorreatividade contra o VACht (transportador vesicular de acetilcolina) (Ogura *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2009) é equivalente nos animais CTRL e STZ, tanto no plano ganglionar como muscular. Os dados sugerem, tal como foi observado no cólon, que a perda neuronal se deve maioritariamente à redução do número de neurónios nitrérgicos, sendo que os neurónios colinérgicos se mantêm praticamente inalterados nos animais STZ comparativamente com os CTRL. Também se pode inferir dos resultados obtidos que o desequilíbrio entre o número de neurónios colinérgicos (excitatórios) e nitrérgicos (inibitórios) verifica-se já em fases precoces (14 dias) da evolução da diabetes no sistema GI.

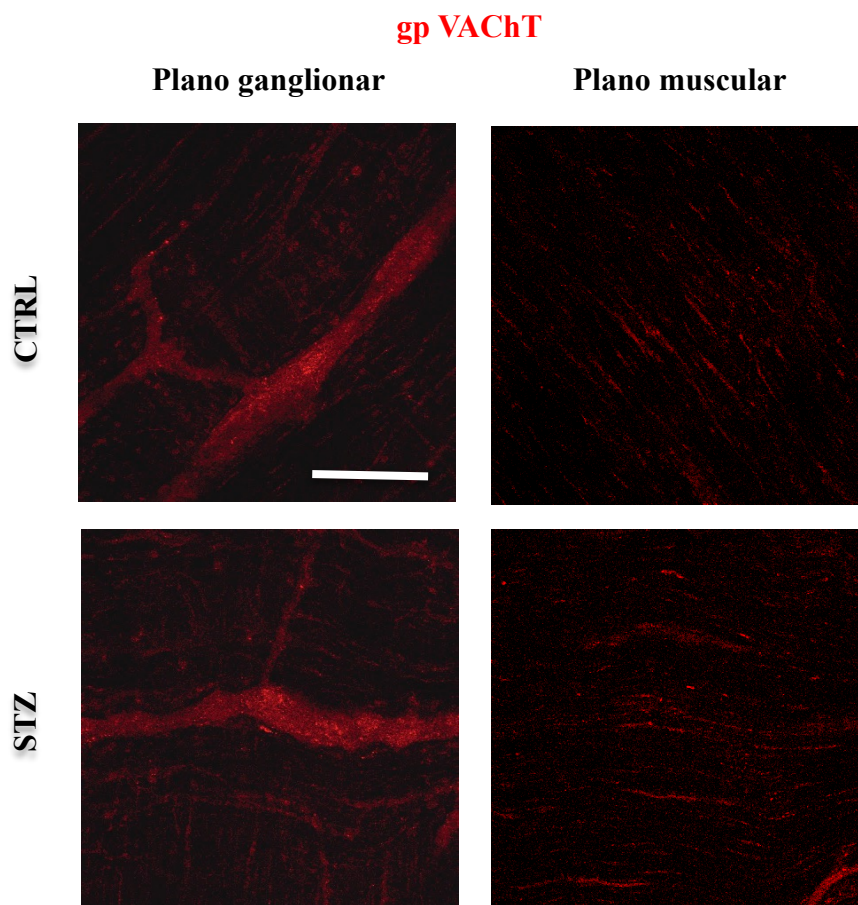


Figura 36 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação simples de gpVACht (vermelho). Escala = 50µM.

Relativamente à marcação obtida com o anticorpo que identifica ICC, ANO-1 (anocetamina 1, canal de cloro ativado pelo cálcio do tipo 1) (Zhu *et al.*, 2009, Sanders *et al.*, 2012,

Gomez-Pinilla *et al.*, 2009), verifica-se que essa coloração é evidente tanto no plano ganglionar como muscular dos animais CTRL. Já nos animais STZ, a marcação das ICC mioentéricas (células estreladas no plano ganglionar) desaparece, mantendo-se evidente no plano muscular (ICC-IM, células fusiformes) (Figura 37). A relação entre a perda de ICC marca-passo do plano ganglionar e a perda de resposta ao mibefradil sobre contrações espontâneas do íleo isolado requer mais estudos, mas pode refletir modificações significativas na atividade das ICC nos indivíduos diabéticos.

rb ANO-1

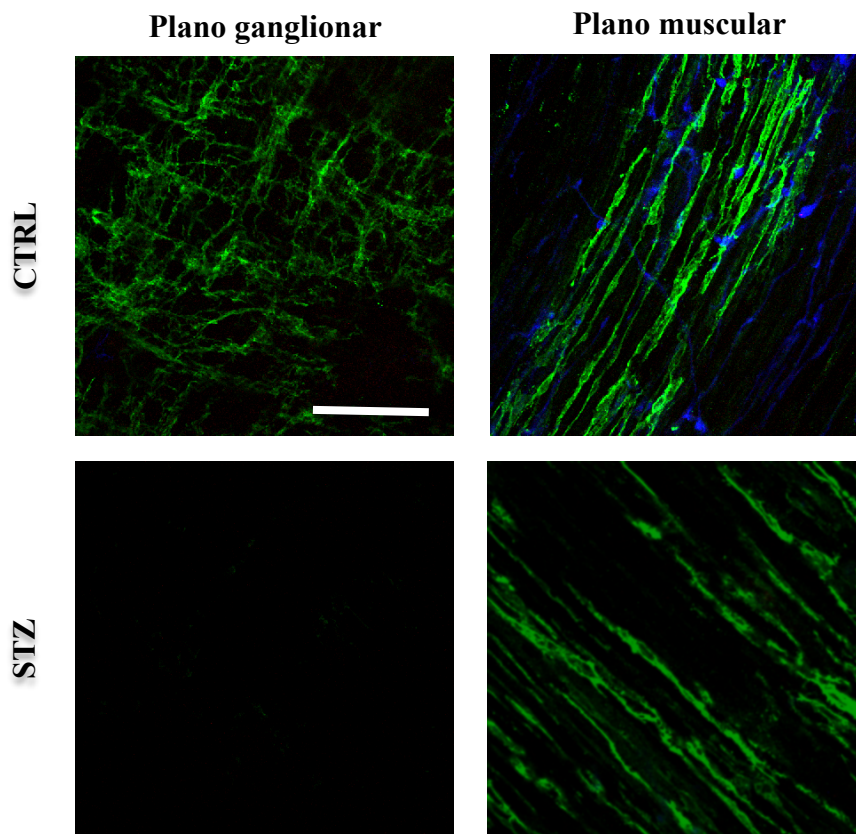


Figura 37 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), nos planos ganglionar e muscular. Marcação simples de rb ANO-1 (verde). Escala = 50µM.

5. Papel dos recetores A1 e A2A da adenosina sobre a libertação de acetilcolina no plexo mioentérico do íleo de animais controlo e diabéticos

Sabendo que apesar da perda neuronal a população de neurónios colinérgicos parece permanecer intacta neste modelo animal, decidimos avaliar o papel neuromodulador da

adenosina na libertação de ACh no ML-PM de ratas diabéticas (Burnstock, 2007, Duarte *et al.*, 2006, Duarte-Araujo *et al.*, 2004, Jacobson and Gao, 2006).

O agonista seletivo dos recetores A_1 da adenosina, R-PIA (300 nM), reduziu a libertação de ACh-[3H] pelas terminações nervosas colinérgicas estimuladas eletricamente (5 Hz, 200 pulsos), tanto em animais CTRL (-36 \pm 4%, $n=5$) como em STZ (-45 \pm 8%, $n=5$) (Figura 38). Curiosamente, o agonista seletivo dos recetores A_{2A} da adenosina, CGS 21680 (3 nM), aumentou a libertação de ACh-[3H] em animais CTRL (53 \pm 10%, $n=4$), mas o seu efeito perdeu-se no ML-PM de animais diabéticos (-19 \pm 7 %, $n=3$) (Figura 38). Estes resultados mostram que o balanço entre a ativação dos recetores facilitatórios A_{2A} e inibitórios A_1 da adenosina está desviado em favor do componente inibitório (A_1) nos animais diabéticos, justificando em parte a redução da motilidade intestinal verificada nestes indivíduos.

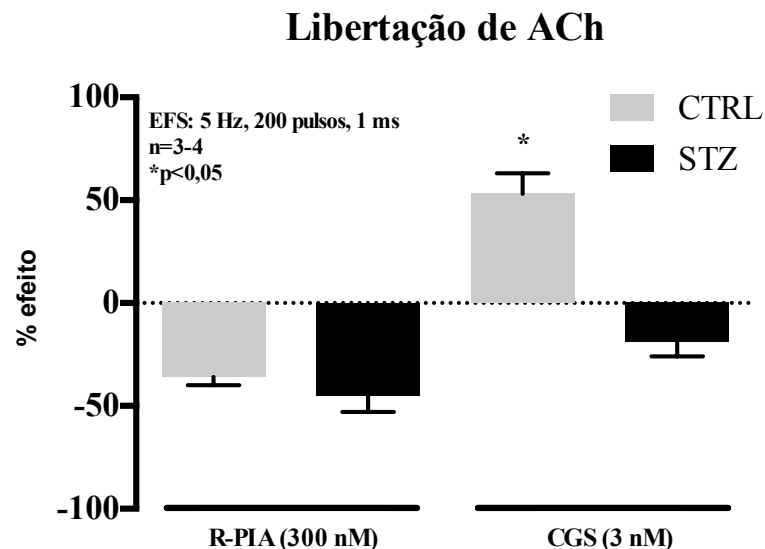


Figura 38 - Libertação de ACh-[3H] do plexo mioentérico de íleo de ratas de animais CTRL e animais STZ. Percentagem de efeito (relativamente ao efeito sem fármacos) observada na presença de agonistas seletivos dos recetores A_1 (R-PIA 300 nM) e A_{2A} (CGS 21680 3 nM) aplicados 15 minutos antes do estímulo S2 (5 Hz, 200 pulsos).

Em trabalhos anteriores (Vieira *et al.*, 2011) mostrou-se, por intermédio da microscopia confocal, que os recetores de subtipo A_1 se localizam predominantemente nos corpos celulares dos neurónios colinérgicos nos gânglios do plexo mioentérico do íleo da ratas, enquanto os recetores excitatórios A_{2A} predominam nas terminações nervosas colinérgicas das junções mioneurais. Os resultados obtidos neste estudo com os animais diabéticos

mostram que a expressão do recetor A_1 permanece praticamente inalterada (Figura 39), ao contrário da perda significativa de marcação contra o recetor A_{2A} verificada nos terminais nervosos colinérgicos do plexo mioentérico que exibem imunorreactividade para o VACHT (Figura 40).

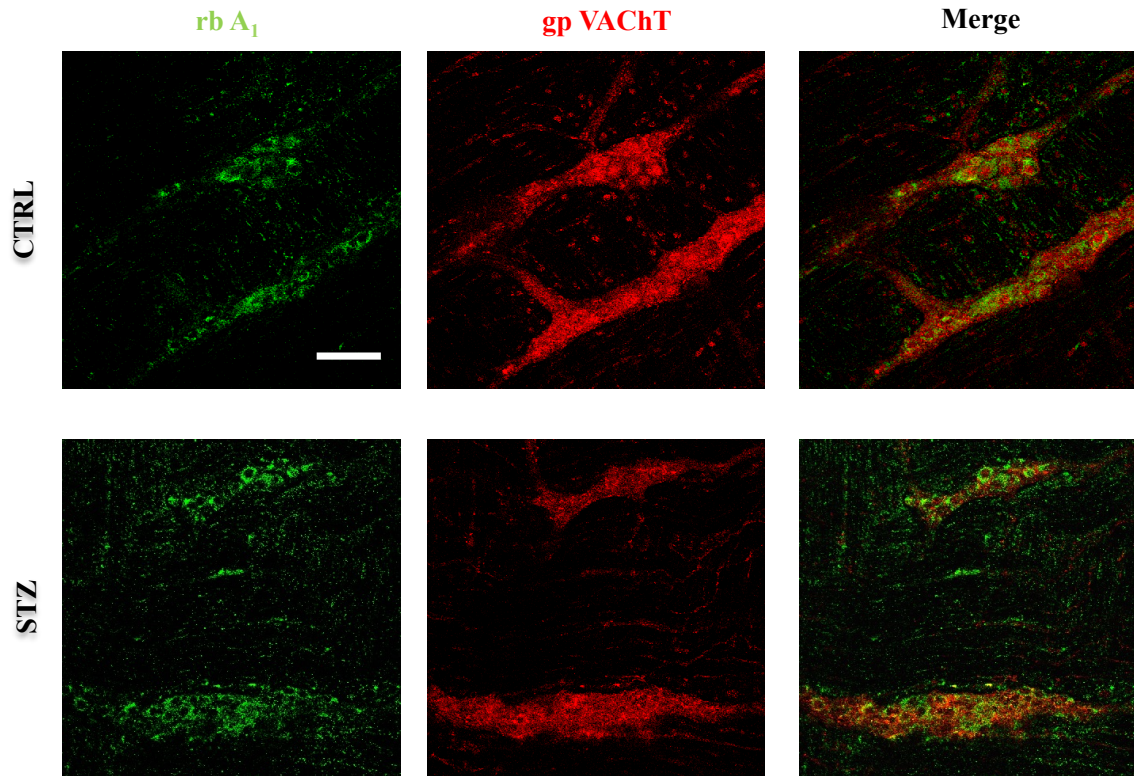


Figura 39 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb A₁ (verde) com gp VACHT (vermelho), Escala = 50μM.

A perda seletiva dos recetores A_{2A} da membrana dos neurónios colinérgicos mioentéricos pode explicar a falta de atividade excitatória da adenosina (CGS 21680) sobre a libertação de ACh-[³H] e o predomínio da atividade inibitória (via recetores A_1) deste neuromodulador nos animais diabéticos.

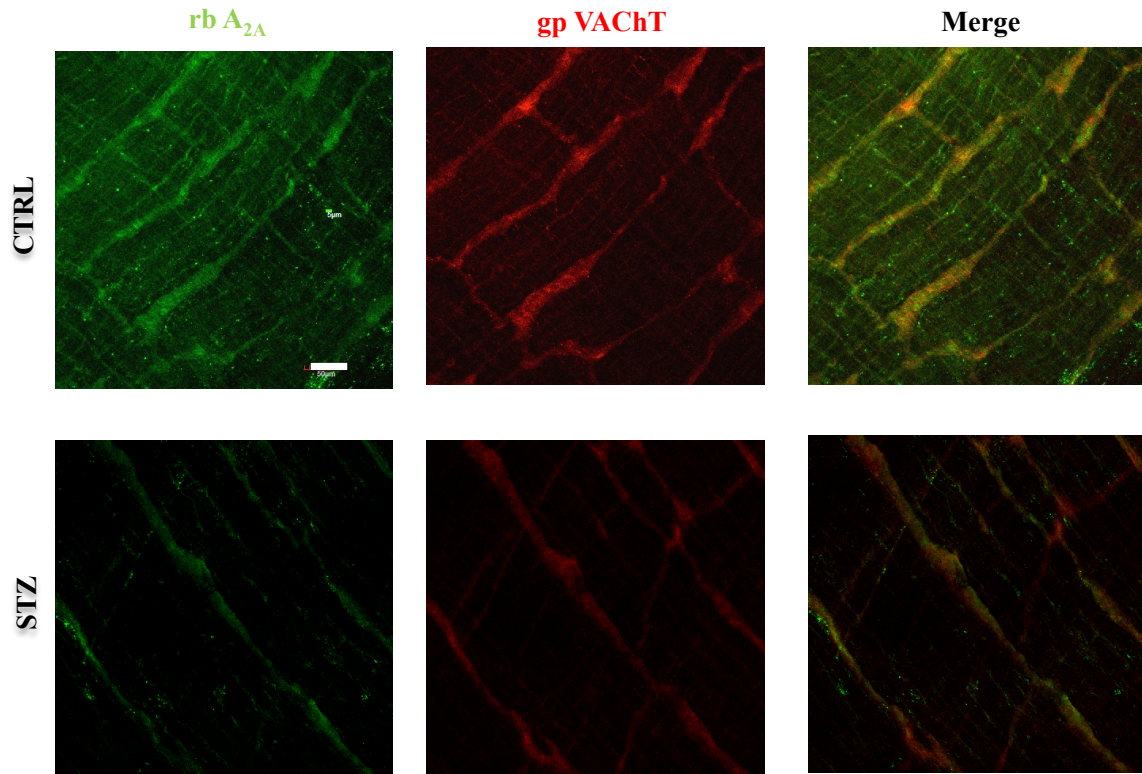


Figura 40 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb A_{2A} (verde) com gp VACHT (vermelho), Escala = 50μm.

6. Catabolismo do ATP, AMP, adenosina e INO no ML-PM do íleo de animais controle e diabéticos

Na Figura 41 estão representadas as cinéticas do catabolismo do ATP (30 μM) em animais CTRL (A) e STZ (B). O tempo de semi-vida do ATP em animais CTRL (A) foi de 7 ± 1 min, tendo-se obtido uma concentração final de ATP de $0,7 \pm 0,3$ μM ($n=6$) aos 45 minutos de incubação. Nos animais STZ (B) o tempo de semi-vida do ATP (30 μM) diminuiu para 4 ± 1 min, tendo-se detectado uma concentração final de ATP idêntica à do CTRL ($0,8 \pm 0,2$ μM, $n=3$). Fazendo uma observação mais detalhada dos primeiros 15 minutos da cinética podemos verificar que a adenosina alcança valores máximos aos 30 min ($12,81$ μM, $n=6$) nos animais CTRL (C), sendo esse valor semelhante ao obtido aos 10 min em animais STZ (D) ($12,18$ μM, $n=3$). Podemos ainda constatar que a formação de INO aos 45 minutos em animais CTRL (9 ± 1 μM, $n=6$) é inferior à obtida em STZ (14 ± 1 μM, $n=3$). Curiosamente verificou-se uma perda de estequiometria mais acentuada nas cinéticas dos animais diabéticos, que passou de 6 μM em animais CTRL (30 μM ao tempo 0 para 24 μM ao

tempo 45) para os 13 μ M (30 μ M ao tempo 0 para 17 μ M ao tempo 45) nos STZ. Estes resultados sugerem uma alteração marcada na cinética de formação/inativação da adenosina a partir do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina (e.g. ATP) (ver abaixo).

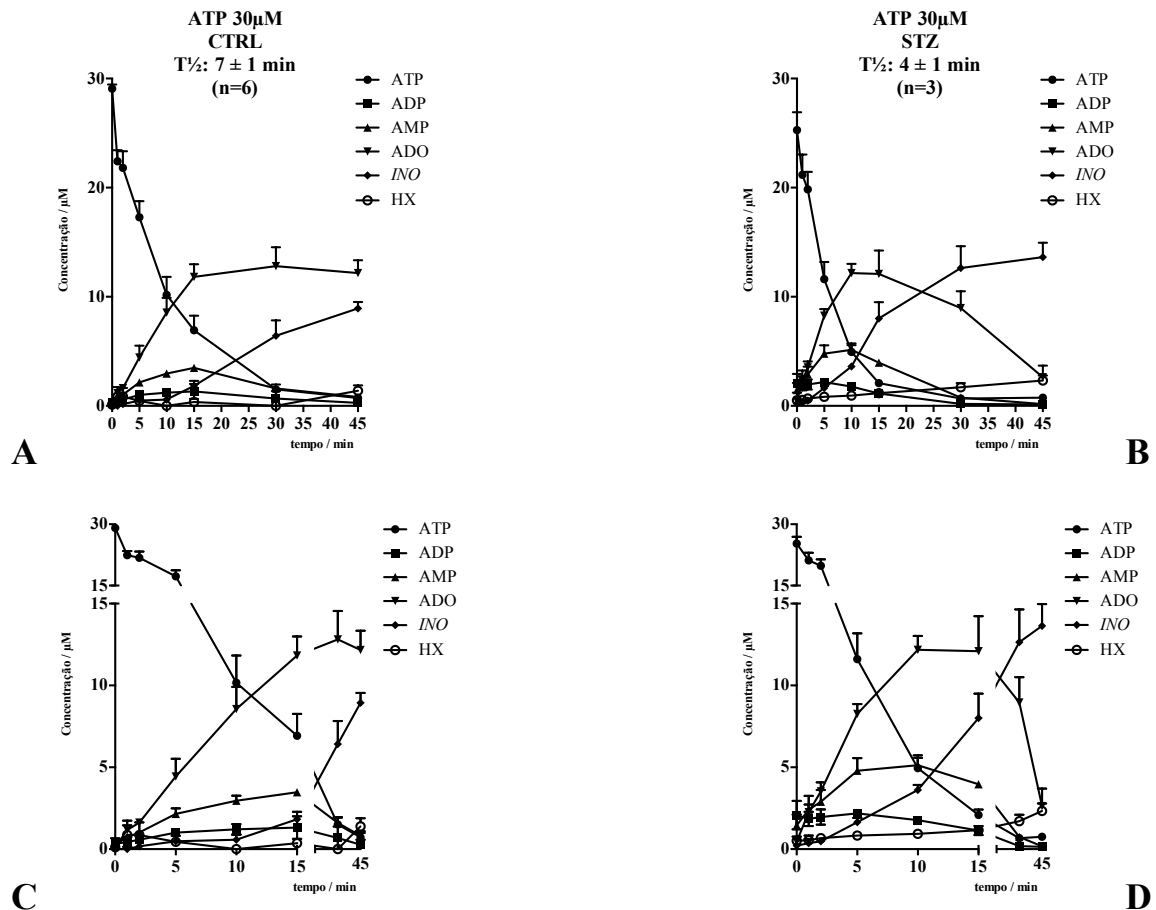


Figura 41 - Cinéticas do catabolismo extracelular do ATP (30 μ M) e da formação dos seus metabolitos (ADP, AMP, adenosina, inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A/C) e em STZ (B/D). Os gráficos C e D representam com maior detalhe o intervalo de tempo dos 0 aos 15 minutos. $T_{1/2}$ = tempo de semi-vida do ATP.

Numa outra representação gráfica (Figura 42) torna-se evidente que a taxa de formação de ADP (por via da NTPDase 2) (A) e AMP (por via das NTPDases 2 e 3) (B) a partir do ATP (30 μ M) foi significativamente maior (* $P < 0,05$) em animais STZ do que em animais CTRL nas primeiras fases da cinética, quando existe uma maior disponibilidade do substrato. Apesar da concentração dos produtos formados, ADP e AMP, em qualquer dos casos ficar aquém dos 10% da concentração inicial do substrato (ATP 30 μ M), estes resultados podem denunciar um ligeiro aumento da atividade das NTPDases 2 e 3 nos

animais diabéticos, tal como reportado num estudo preliminar anterior (Gonçalves-Monteiro, 2013). A repercussão funcional deste aumento muito ligeiro na concentração de ADP e AMP proveniente do catabolismo extracelular do ATP carece de comprovação em estudos futuros.

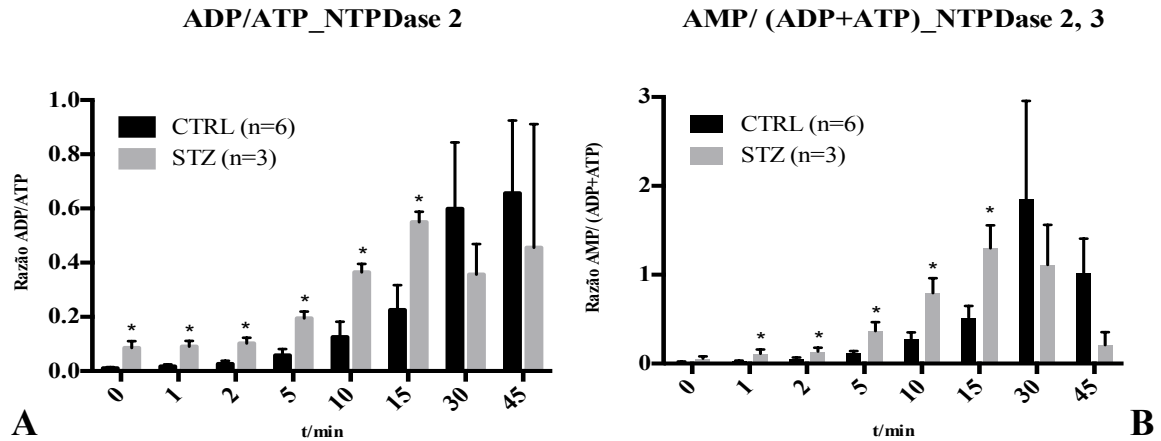


Figura 42 - Gráficos das razões da formação de ADP e AMP através das NTPDases. Gráfico da taxa de formação de ADP (atividade da NTPDase 2) (A), e gráfico da taxa de formação de AMP (atividade da NTPDase 2 e 3) (B) a partir do ATP (30 μ M) em animais CTRL e animais STZ. Média \pm SEM. *P<0,05.

A expressão das duas enzimas responsáveis pela metabolização extracelular do ATP no plexo mioentérico, NTPDase 2 e 3 (ver Vieira *et al.*, 2014) foi avaliada em animais diabéticos por imunofluorescência aplicada à microscopia confocal. Podemos observar na Figura 43 que a NTPDase 2 (verde) se localiza predominantemente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares e na rede nervosa primária e secundária do plexo mioentérico marcada positivamente com PGP (vermelho), tanto em animais CTRL como STZ. Quanto à rede neuronal terciária, a marcação obtida com PGP não é acompanhada pela marcação do anticorpo contra a NTPDase 2, mostrando que esta enzima não está presente nos terminais nervosos da junção mioneuronal em nenhum dos grupos de animais.

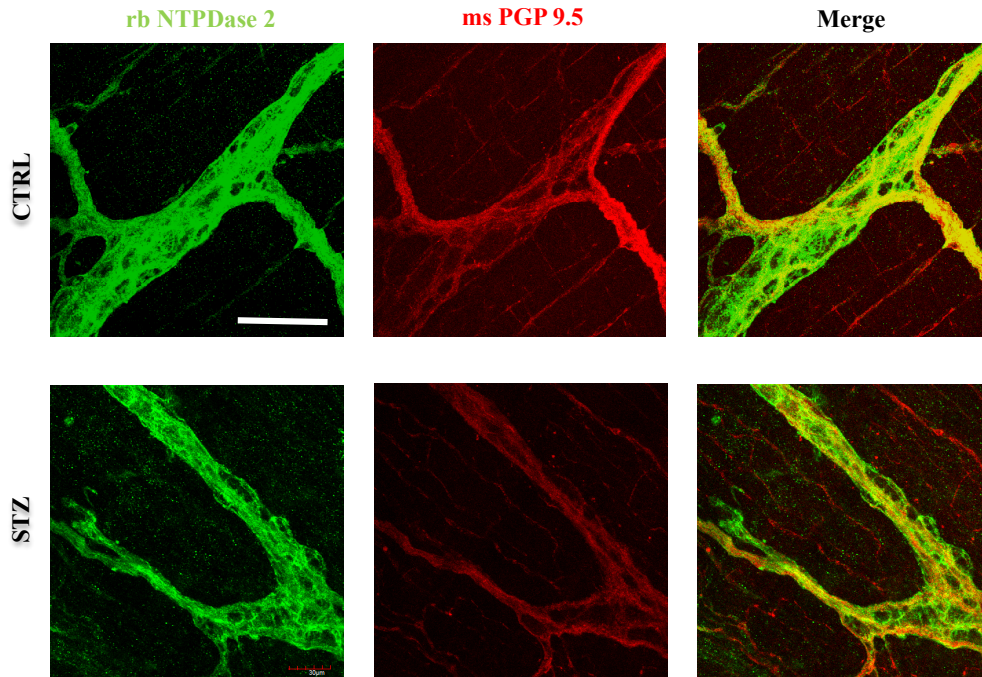


Figura 43 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb NTPDase 2 (verde) com ms PGP (vermelho), Escala = 50 μ M.

No que respeita à expressão da NTPDase 3 também não se observaram diferenças evidentes entre os dois grupos de animais, CTRL e STZ, talvez com uma ligeira tendência para uma maior marcação desta enzima nos corpos celulares dos neurónios ganglionares dos animais diabéticos (dado a confirmar com a realização de mais experiências). A NTPDase3 (verde) colocaliza com PGP (vermelho) (Figura 44), marcando tanto os gânglios mioentéricos como as redes neuronais primária, secundária e terciária.

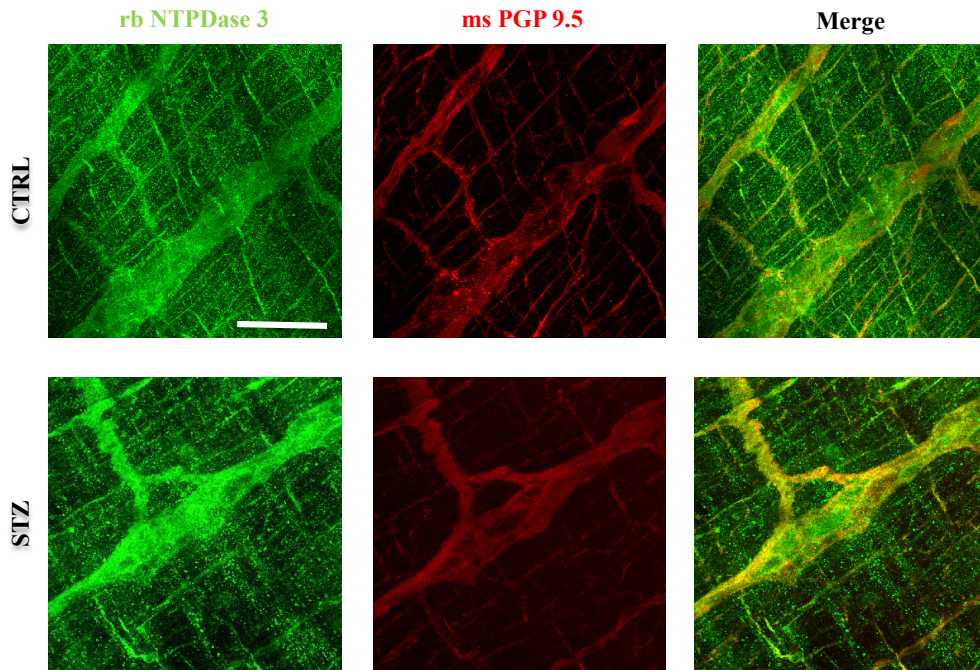


Figura 44 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior). Marcação dupla de rb NTPDase 3 (verde) com ms PGP (vermelho), Escala = 50 μ M.

Analisando a cinética do catabolismo extracelular do AMP (30 μ M) e a formação dos seus metabolitos ao longo do tempo (Figura 45), constata-se que o tempo de semi-vida do AMP nos animais diabéticos (B) é significativamente (* $P < 0,05$) inferior (4 ± 1 min, $n=4$) ao dos controlos (A) (15 ± 2 min, $n=3$). A concentração de AMP ao fim de 45 minutos de incubação era ainda de 6 ± 3 μ M nos animais controlo e apenas $0,1 \pm 0,1$ μ M no PM-ML do íleo dos animais STZ.

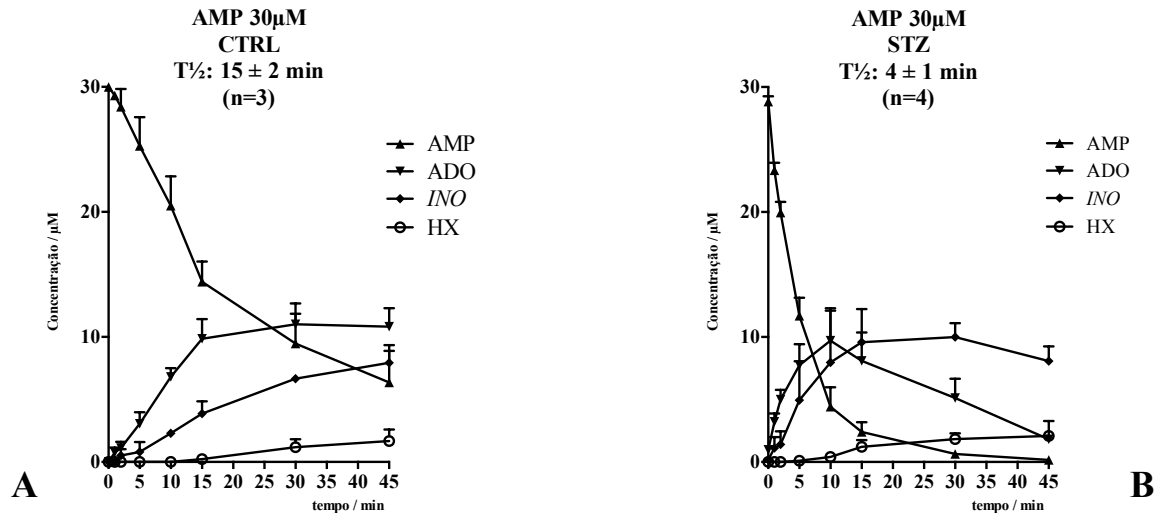


Figura 45 - Cinéticas do catabolismo extracelular do AMP (30 μM) e da formação dos produtos do seu catabolismo (adenosina, inosina e hipoxantina), em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e STZ (B). T_{1/2} = tempo de semi-vida do ATP.

Avaliando a taxa de formação dos nucleósidos de adenina a partir do AMP (30 μM) dada pela razão (ADO+INO+HX)/AMP que reflete a atividade da E-5'-nucleotidase, verifica-se que ao fim de 45 minutos de incubação com o substrato esta foi significativamente (**P<0,001) maior em animais STZ (77±15) do que nas ratazanas CTRL (3,2±0,1). O aumento da atividade da E-5'-nucleotidase não se deve a um aumento compatível da expressão da enzima nas fibras musculares lisas dos animais diabéticos, como se demonstra na Figura 46. Nestas experiências, verificou-se que a marcação com o anticorpo específico contra a E-5'-nucleotidase (verde) predomina nas fibras musculares lisas subjacentes às terminações nervosas marcadas com PGP (vermelho) (cf. (Nitahara *et al.*, 1995, Vieira *et al.*, 2014)) e que o padrão de marcação da E-5'-nucleotidase não segue a perda neuronal (redução da marcação com PGP, seta amarela) já relatada anteriormente nos animais diabéticos STZ comparativamente com as ratazanas CTRL (Figura 46).

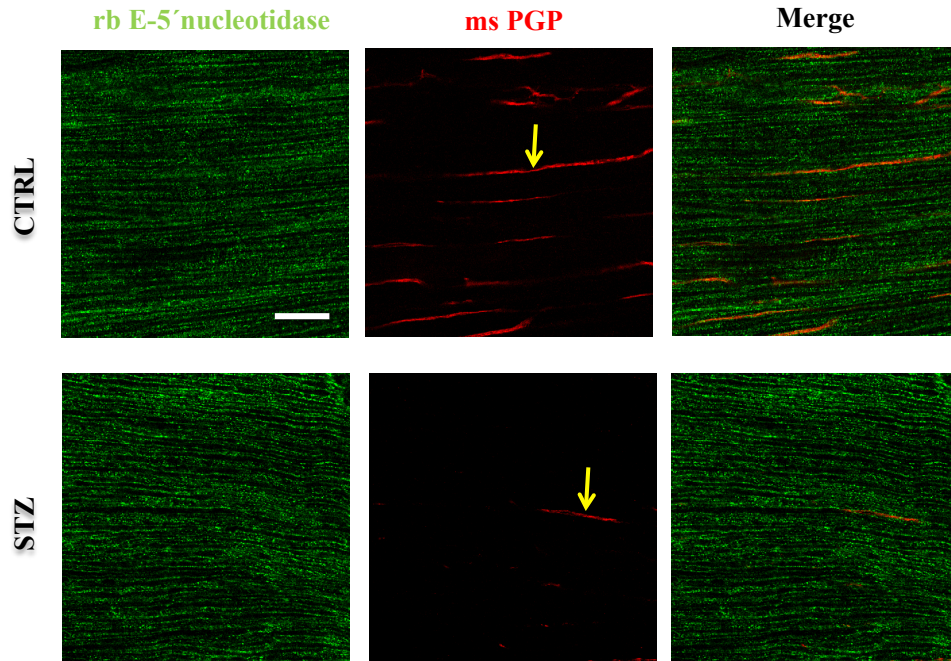


Figura 46 - Imagens de imunofluorescência associada à microscopia confocal obtidas a partir de preparações de ML-PM do íleo de ratas CTRL (parte superior) e STZ (parte inferior), no plano muscular. Marcação dupla de rb E-5'-nucleotidase (verde) com ms PGP (vermelho). Escala = 50µM. Fibras nervosas (seta amarela).

Curiosamente, apesar da taxa de formação de adenosina ser mais rápida em animais diabéticos (ver Figura 42), esse facto não se traduz num aumento da acumulação de adenosina ao longo do tempo. A concentração máxima de adenosina detetada no meio de incubação foi de $10 \pm 1 \mu\text{M}$ ($n=3$) 45 minutos após a adição do substrato AMP ($30 \mu\text{M}$) nos animais CTRL. Já nos animais STZ, a concentração máxima de adenosina ($10 \pm 2 \mu\text{M}$, $n=4$) detetada foi obtida aos 10 minutos de incubação com o AMP ($30 \mu\text{M}$). Nos animais diabéticos, observou-se uma perda de estequiometria ($*P<0,05$) da reação após a adição do substrato AMP ($30 \mu\text{M}$); o défice de estequiometria passou de $3 \mu\text{M}$ ($30 \mu\text{M}$ ao tempo 0 para $27 \mu\text{M}$ ao tempo 45) nos animais CTRL para $18 \mu\text{M}$ ($30 \mu\text{M}$ ao tempo 0 para $12 \mu\text{M}$ ao tempo 45) nos animais STZ, sugerindo a existência de um “escape” dos produtos formados (ADO, INO, HX) para o interior das células com a, consequente, redução da sua concentração no meio de incubação analisado por HPLC.

A análise das cinéticas de inativação da ADO ($30 \mu\text{M}$) em animais CTRL e STZ (Figura 47) mostra que a ADO ($30 \mu\text{M}$) é mais rapidamente inativada nos animais STZ ($t_{1/2} = 13 \pm 3$ minutos, $n=4$) do que nas ratas CTRL ($t_{1/2} = 34 \pm 1$ minutos, $n=4$). Considerando as

vias de inativação da ADO no meio extracelular, degradação enzimática em INO pela desaminase da adenosina (ADA) e/ou recaptção celular por transporte facilitado, podemos concluir que este último poderá contribuir em maior medida para o aumento da taxa de desaparecimento da ADO no ML-PM do íleo de ratas STZ. Esta conclusão deve-se aos seguintes factos: (1) a taxa de formação de INO a partir da ADO (atividade da ADA) está significativamente ($*P<0.05$) diminuída nos animais STZ comparativamente com os CTRL (Figura 47); e (2) observou-se uma perda de estequiometria ($-17\mu\text{M}$) que foi significativamente ($*P<0.05$) maior no PM-ML do íleo das ratas diabéticas STZ do que nos animais CTRL.

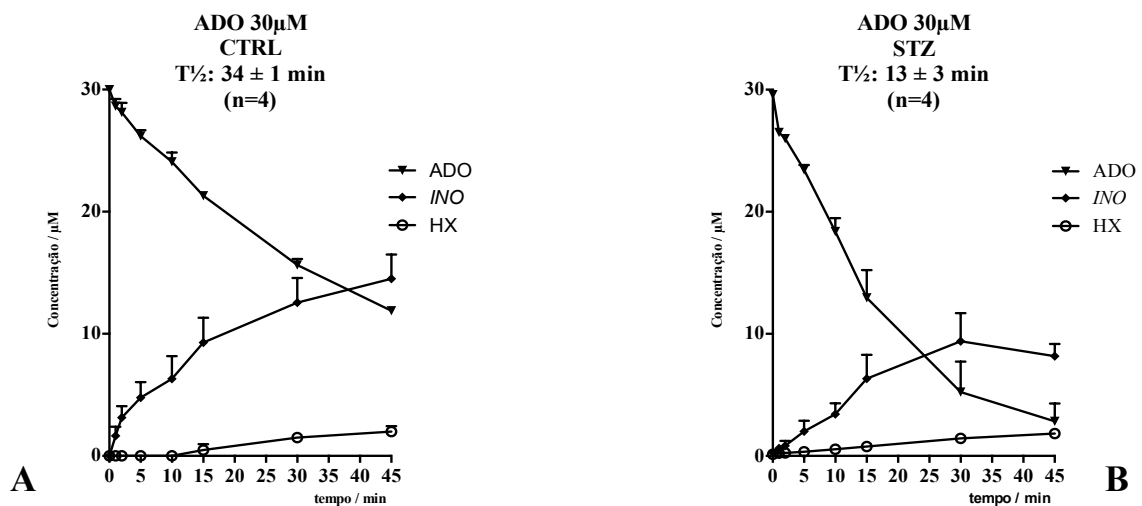


Figura 47 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO ($30\mu\text{M}$) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina), em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e em STZ (B). $T_{1/2}$ = tempo de semi-vida da ADO.

De modo a avaliar o envolvimento da inosina (INO) na perda de estequiometria observada nas cinéticas do catabolismo da ADO em animais STZ, decidimos realizar cinéticas da metabolização da INO ($30\mu\text{M}$) e formação de HX.

A metabolização extracelular da INO ($30\mu\text{M}$) é praticamente inexistente em animais CTRL (semi-vida >300 min, $n=2$) (Figura 48 A). Nos animais STZ a metabolização da INO com a formação de HX acontece de forma mais rápida; o tempo de semi-vida da INO foi <100 min ($n=3$), refletindo um aumento da atividade da purina nucleósido fosforilase (PNP). Ao fim de 45 minutos de incubação com INO, a formação de HX foi de $8\pm1\mu\text{M}$ em

animais STZ e de $1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ em CTRL. Destacamos que, embora a metabolização seja mais rápida nos animais STZ, a estequiometria ao cabo de 45 minutos manteve-se inalterada ($30 \mu\text{M}$) nos dois grupos de animais. No seu conjunto estes resultados mostram que a perda de estequiometria observada nas cinéticas de inativação do ATP, AMP e ADO no íleo de animais STZ deve ser atribuída ao aumento da recaptção celular da ADO por transportadores equilibrativos (dependentes do gradiente do nucleósido) e/ou concentrativos (dependentes do gradiente de sódio através da membrana plasmática).

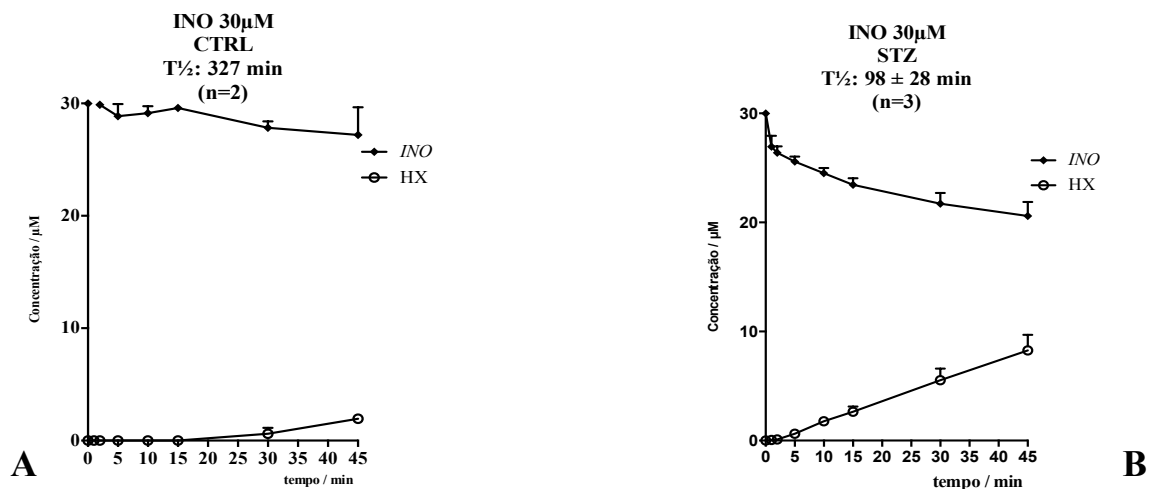


Figura 48 - Cinéticas do catabolismo extracelular da INO ($30 \mu\text{M}$) e da formação do produto do seu catabolismo (hipoxantina) em função do tempo de incubação, em animais CTRL (A) e em STZ (B). $T_{1/2}$ = tempo de semi-vida da INO.

A inibição da atividade da enzima responsável pela inativação da ADO no PM-ML do íleo de ratas CTRL, a ADA, pela eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil) adenina (EHNA, $50 \mu\text{M}$) (ver (Correia-de-Sa *et al.*, 2006, Duarte-Araujo *et al.*, 2004)) preveniu quase por completo a metabolização da ADO em INO em ambos os grupos de animais, CTRL e STZ (Figura 49). Contudo, a presença de EHNA ($50 \mu\text{M}$) não foi capaz de prevenir a perda de ADO do meio de incubação com o ML-PM de animais diabéticos ($t_{1/2} = 130 \pm 34 \mu\text{M}$, $n=4$), ao contrário do observado nas ratas do grupo CTRL ($t_{1/2} = 250 \pm 17$ min, $n=4$). Na presença deste inibidor a estequiometria ao fim de 45 minutos foi menor nos animais STZ ($24 \mu\text{M}$, $n=4$) do que no grupo CTRL ($26 \mu\text{M}$, $n=4$), reforçando a possibilidade da

inativação da ADO extracelular nos animais diabéticos se dever maioritariamente a um aumento da recaptação celular.

Para testar esta hipótese foram realizadas cinéticas de inativação da ADO na ausência e na presença de inibidores do transporte equilibrativo de nucleósidos, dipiridamol (0.5 μ M) e NBTI (30 μ M), e do transporte concentrativo de adenosina, oubaína (2 mM). A oubaína é um inibidor da sódio-potássio ATPase necessária ao influxo concentrativo da adenosina através da membrana plasmática (Baldwin *et al.*, 2004, Gray *et al.*, 2004, King *et al.*, 2006).

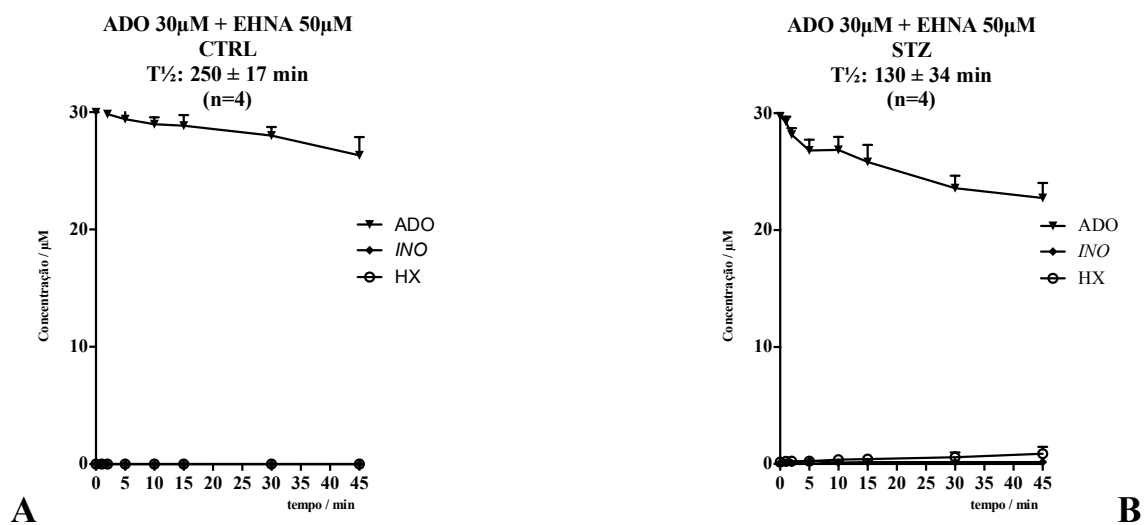


Figura 49 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de EHNA (50 μ M) em animais CTRL (à direita) e STZ (à esquerda). $T_{1/2}$ = tempo de semi-vida da ADO.

A presença de dipiridamol (0.5 μ M) aumentou significativamente (* $P < 0.05$) o tempo de semi-vida da ADO (30 μ M) de 34 \pm 1 minutos ($n=4$) para 76 \pm 9 minutos ($n=3$) no ML-PM do íleo de animais CTRL (Figura 50 A) (Duarte-Araujo *et al.*, 2004). Já nos animais STZ, o efeito do dipiridamol (0.5 μ M) deixou de ser observado, uma vez que o tempo de semi-vida da ADO (30 μ M) foi semelhante na ausência (13 \pm 3 minutos, $n=4$) e na presença (16 \pm 3 min, $n=3$) deste inibidor (Figura 50 B). A perda de estequiometria verificada nos animais diabéticos STZ manteve-se na presença do dipiridamol (0.5 μ M), restando apenas 15 μ M no final da cinética (30 μ M ao tempo 0 para 15 μ M ao tempo 45).

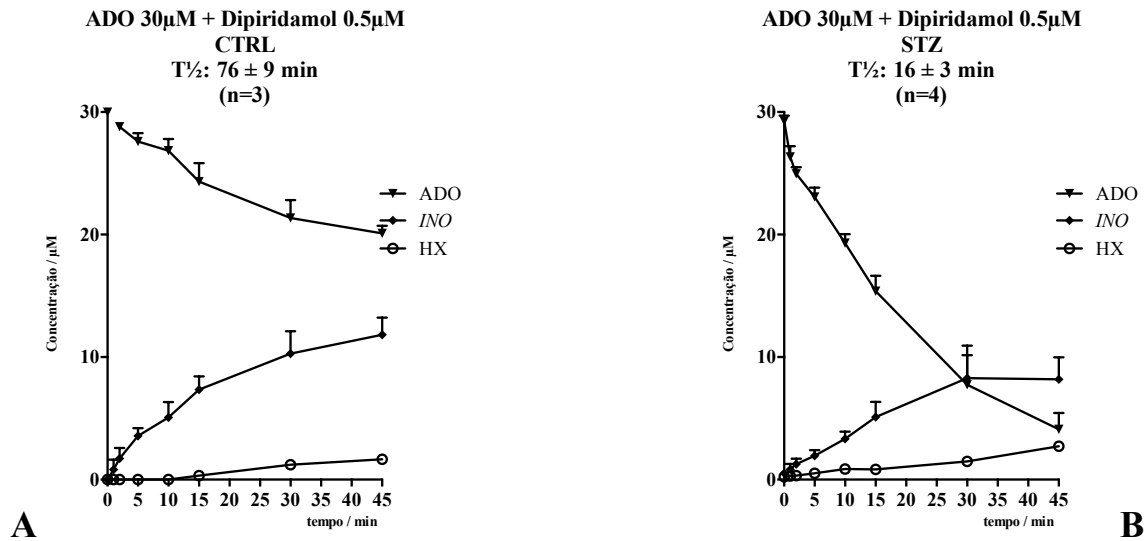


Figura 50 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 µM) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de dipiridamol (0.5 µM) em animais CTRL (A) e STZ (B). T_{1/2} = tempo de semi-vida da ADO.

O uso de outro inibidor do transporte equilibrativo de nucleósidos, NBTI (30 µM), também não alterou significativamente as diferenças verificadas nas cinéticas de inativação da ADO (30 µM) no ML-PM do íleo de ratas CTRL (t_{1/2} = 34 ± 1 minutos, n=4) e STZ (t_{1/2} = 14 ± 4 minutos, n=4), embora tenha recuperado parcialmente a perda de estequiometria anteriormente observada (Figura 51).

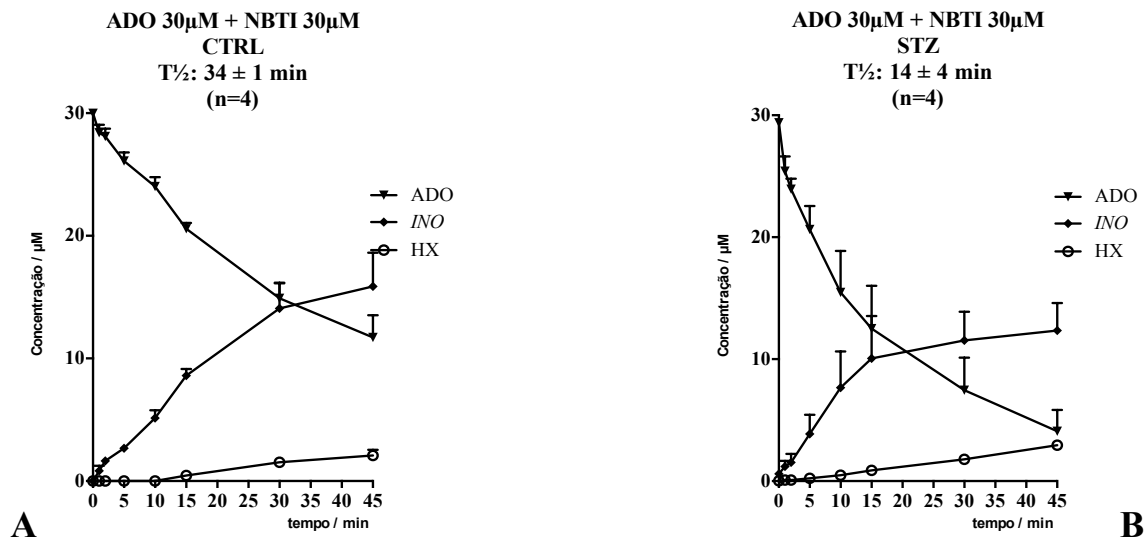


Figura 51 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 µM) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de NBTI 30 µM, em animais CTRL (à direita) e em STZ (à esquerda). T_{1/2} = tempo de semi-vida da ADO.

Verificou-se assim que nos animais diabéticos a sensibilidade dos transportadores equilibrativos para os inibidores assume um comportamento diferente (dipiridamol insensíveis, NBTI sensíveis) do observado nos controlos (dipiridamol sensíveis, NBTI insensíveis). Paralelamente, a perda de estequiometria que se verificava nos animais STZ manteve-se na presença do dipiridamol mas recuperou parcialmente na presença do NBTI.

Esta alteração dos mecanismos envolvidos no transporte equilibrativo da adenosina em animais diabéticos levou-nos a testar o efeito de um inibidor da bomba sódio-potássio ATPase (oubaína, 2 mM) da qual os transportadores concentrativos dependem para atuarem na membrana da célula (Gray *et al.*, 2004, Read *et al.*, 1979).

As cinéticas do catabolismo da ADO (30 μ M) realizadas em animais STZ na presença de oubaína (2 mM) foram comparadas com resultados já publicados, que referiam a ausência de efeito desse fármaco em animais CTRL (Duarte-Araujo *et al.*, 2004). Pela análise da Figura 52 verificamos que em animais STZ a semi-vida da ADO na presença de oubaína (20 ± 5 min, $n=4$) deixa de ser tão rápida quanto a observada na ausência do fármaco (13 ± 3 minutos, $n=4$). Adicionalmente verificou-se uma recuperação parcial da perda de estequiometria, que passou de 17 μ M (30 μ M ao tempo 0 para 13 μ M ao tempo 45) para 10 μ M (30 μ M ao tempo 0 para 20 μ M ao tempo 45) na presença de oubaína.

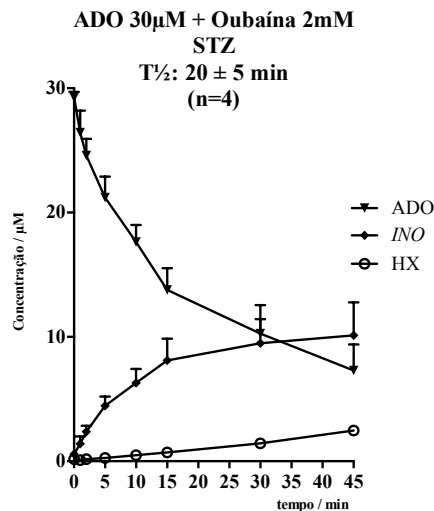


Figura 52 - Cinéticas do catabolismo extracelular da ADO (30 μ M) e da formação dos produtos do seu catabolismo (inosina e hipoxantina) em função do tempo de incubação, na presença de oubaína (2 mM), em animais STZ. T $\frac{1}{2}$ = tempo de semi-vida da ADO.

Estes resultados preliminares parecem indicar que nos animais diabéticos a perda da estequiometria está relacionada com uma alteração no transporte de adenosina. Assim o transporte de adenosina deixa de ser equilibrativo sensível ao dipiridamol (em controlos) para ser equilibrativo sensível ao NBTI e concentrativo sensível à oubaína, nos animais diabéticos.

V. DISCUSSÃO

A *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença crónica de elevada prevalência, causadora de importantes complicações médicas. Os efeitos da diabetes na motilidade GI foram negligenciados durante muitos anos, bem como a sua fisiopatologia. Hoje em dia, sabe-se que as alterações GI secundárias à diabetes afetam cerca de 76% dos indivíduos (Talubmook *et al.*, 2003). A patogenia da dismotilidade GI é de natureza complexa, multifatorial e não está completamente elucidada. Os principais mecanismos de disfunção gastrointestinal incluem anomalias funcionais, hipersensibilidade visceral, alteração na secreção de hormonas gastrointestinais, inflamação e disfunção do sistema nervoso autónomo (Gatopoulou *et al.*, 2012).

Após revisão da bibliografia constata-se que existe uma lacuna no estudo da sinalização purinérgica no aparelho GI dos indivíduos diabéticos. Espera-se que este trabalho ajude a clarificar as alterações observadas no íleo de ratazanas onde a diabetes foi induzida pela injeção de STZ e contribua para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos, nomeadamente no que diz respeito à sinalização purinérgica.

A primeira etapa do trabalho consistiu em implementar um modelo de DM tipo 1 que manifestasse as alterações digestivas alvo deste trabalho. A opção pelo modelo de DM tipo 1 teve em consideração a prevalência e gravidade das repercussões GI desta doença, associada ao facto de que os doentes portadores desta patologia, embora em menor número (apenas 10% do total dos diabéticos) que os de DM tipo 2 são detetados mais precocemente e, por isso, vivem mais anos com a doença.

Os modelos animais utilizados para o estudo de DM tipo 1 podem ser modelos cirúrgicos (remoção do pâncreas, muito invasivo), espontâneos (como os ratos NOD e as ratazanas BB) ou químicos (induzidos pela administração de aloxano ou estreptozotocina, por exemplo). A grande vantagem dos modelos espontâneos de diabetes tipo 1 relativamente aos químicos é o fato das alterações observadas se deverem quase exclusivamente à diabetes e não aos efeitos tóxicos paralelos do agente indutor da diabetes. No entanto, os modelos espontâneos não permitem a comparação com animais controlo da mesma estirpe e estão mais predispostos a complicações infecciosas que os modelos químicos (Eisenbarth, 2004, Giarratana *et al.*, 2007, King, 2012, Rees and Alcolado, 2005).

Pelas razões apontadas, neste trabalho optou-se por um modelo de DM tipo 1 induzido quimicamente (STZ), já que este permite a comparação dos resultados com animais controlo da mesma estirpe, género e idade. A indução foi realizada com a administração de estreptozotocina (STZ), que deve o seu efeito diabetogénico a um efeito tóxico direto sobre as células β pancreáticas levando à sua eliminação e à, consequente, redução da produção de insulina (ver Introdução). A morbilidade e a mortalidade dos animais resultantes da administração de STZ tem sido pouco relatada na literatura, nomeadamente no que respeita às duas primeiras semanas após o tratamento (este trabalho); frequentemente, os estudos descritos na literatura são mais prolongados sendo realizados entre as 2 e 8 semanas após a injeção de STZ. Neste estudo a taxa de sobrevivência dos animais foi de 100%. Quanto à taxa de eficácia na indução da diabetes pela STZ estão relatados valores de 85-90%, que foram de 95% neste ensaio. Há várias variáveis que podem interferir na eficácia da indução da diabetes pela STZ em roedores, tais como a estirpe, o género (as fêmeas podem apresentar uma resposta mais variável), a dieta, fatores ambientais, entre outros (Deeds *et al.*, 2011, Ismail ZB, 2009).

A utilização de um modelo precoce (14 dias) de DM tipo 1 induzido pela STZ levanta questões sobre a sua validade e afeção dos órgãos-alvo, nomeadamente o trato GI que é o foco principal deste trabalho. O intervalo de tempo decorrido para a realização dos ensaios em animais diabéticos induzidos por injeção com STZ varia muito na literatura, indo desde alguns dias (Coulson *et al.*, 2002) até várias semanas, ou mesmo meses (Coulson *et al.*, 2002, Duarte *et al.*, 2006, Martinez-Cuesta *et al.*, 1995, Talubmook *et al.*, 2003). Neste trabalho optou-se por avaliar num grupo de animais selecionado, parâmetros que podem estar afetados nos doentes com DM tipo 1, tais como o consumo de comida e de água, a variação de peso e os níveis de glicemia, considerando sempre o bem-estar dos animais. Os resultados obtidos nas duas semanas de observação mostram que os animais exibem polifagia, polidipsia e poliúria. O aumento no consumo de comida nos animais diabéticos foi de cerca de 90% comparativamente com os animais CTRL, e um consumo de água 7 vezes superior (Fox *et al.*, 1999, Tesch and Allen, 2007). Esta situação implicou a implementação de cuidados acrescidos de manejo para garantir o bem-estar dos animais, incluindo a mudança mais frequente (diária) das camas e o aumento do número de folhas de papel absorvente (enriquecimento ambiental) sobre a cama, para atenuar o impacto da poliúria e das fezes de menor consistência sobre os animais.

Apesar do aumento significativo no consumo de comida e água, os animais STZ perderam em média 4 gr por dia, enquanto os CTRL aumentaram consistentemente 1,5 gr por dia. Esta perda significativa de peso é notória principalmente nos primeiros dias após a injeção de STZ coincidindo com o aumento dos valores de glicemia, que nestes animais se manteve acima dos 300 mg/dL após o segundo dia e atingiu valores superiores a 400 mg/dL após o sétimo dia. Modelos animais de DM tipo 1 com valores de glicemia acima dos 400 mg/dL reproduzem um cenário próximo à realidade humana, com pouca interferência da insulina endógena e baixa probabilidade de recuperação das ilhotas de *Langherans* (Deeds *et al.*, 2011).

Neste contexto, as experiências para avaliar a morfologia e função do sistema GI foram realizadas sistematicamente ao 14º dia após a injeção de STZ (grupo STZ) ou tampão citrato (grupo CTRL). O trânsito GI foi avaliado *in vivo* através da progressão ao longo do tubo digestivo do corante azul-de-metileno aplicado por entubação orogástrica normalizado pelo comprimento total do intestino delgado. Os resultados desta avaliação mostram que os animais do grupo STZ apresentam um atraso no trânsito gastrointestinal comparativamente com os animais CTRL, tal como foi reportado em pacientes humanos. A lentificação do trânsito intestinal nos doentes diabéticos pode permitir a proliferação bacteriana e explicar os quadros de alternância entre obstipação e diarreia característicos dos pacientes diabéticos (Scarpello *et al.*, 1976).

A lentificação do trânsito GI pode ser explicada tanto pela perda de neurónios mioentéricos (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007a, Hisano, 2007, Bagyánszki and Bódi, 2012, Zanoni and Hermes-Uliana, 2015) como pela própria hiperglicemia, que cursa com um atraso no esvaziamento gástrico (Rayner and Horowitz, 2006, Horowitz and Samsom, 2004) e alternativamente, a redução do número e/ou da atividade das ICC, as células marca-passo responsáveis pela geração/propagação e ritmicidade das contrações espontâneas da musculatura lisa intestinal, pode também contribuir para explicar as alterações do trânsito GI verificadas nos diabéticos (Furness, 2008, Yarandi and Srinivasan, 2014, Zochodne and Malik, 2014).

Ao exame macroscópico da cavidade abdominal verificou-se que os animais STZ apresentavam uma perda significativa da gordura intervisceral (Figura 25), que pode ser devida à mobilização das reservas energéticas a partir dos lípidos na ausência de insulina

capaz de promover o transporte de glicose para o interior das células. A falta de gordura visceral pode correlacionar-se com a perda de peso verificada nos diabéticos insulínos dependentes (tipo 1) (Chaudhry *et al.*, 2013). A perda de peso depende, ainda, da estirpe e do género dos animais utilizados, pelo que o processo parece ser multifatorial e um pouco mais complexo do que o descrito acima (Akbarzadeh *et al.*, 2007, Chaudhry *et al.*, 2013, Deeds *et al.*, 2011, Szkudelski, 2001).

A avaliação morfológica do tubo digestivo dos animais STZ mostrou um aumento significativo das dimensões do íleo e do cego normalizado pelo tamanho da tibia, atingindo estas proporções extraordinariamente maiores do que as observadas nos animais CTRL. Este resultado é concordante com outros já publicados que mostram uma dilatação do cego que pode atingir proporções 60% superiores aos animais controlo (Ferreira *et al.*, 2013). De entre as causas apontadas para justificar este fenómeno encontra-se a perda de inervação, que é simultaneamente causadora potencial dos distúrbios de motilidade e dos fenómenos de pseudo-obstrução associados à diabetes (Lang, 2009). Curiosamente, as diferenças entre o peso do íleo “a fresco” nos animais STZ e CTRL desaparecem após secagem da preparação por um período de 48 horas (peso “seco”). O aumento do peso do intestino tem sido descrito por outros autores (Coulson *et al.*, 2002, Nowak *et al.*, 1990). Este pode ser atribuído (1) ao excesso de produção de “glucagon-like-peptide 2” (GLP-2) no íleo terminal e cólon após a administração de STZ que favorece a proliferação das células epiteliais (Horowitz and Samsom, 2004), ou (2) à presença de edema observado entre as vilosidades intestinais em modelos de diabetes (Gazia MMA, 2012). Estudos preliminares do nosso grupo detetaram, ainda, a presença de espessamento das camadas musculares no íleo de animais STZ comparativamente aos CTRL, desconhecendo-se se a origem desse fenómeno se deve à hiperplasia ou hipertrofia das fibras musculares ou, eventualmente, à invasão dessas camadas por outras células ou líquido intersticial (Mendes-Henriques, 2015). O desaparecimento das diferenças encontradas no peso do íleo após secagem das preparações aponta para uma contribuição dominante da infiltração edematosa no intestino dos animais diabéticos STZ.

Para além das alterações macroscópicas funcionais e estruturais encontradas no tubo digestivo dos animais diabéticos STZ, procurámos estudar com maior detalhe as repercussões locais sobre o funcionamento *in vitro* do íleo de animais diabéticos STZ com 14 dias de evolução. Os registos da atividade miográfica do íleo de animais STZ

mostraram que este possui perda da ritmicidade acompanhada de um aumento da amplitude das contrações espontâneas quando comparado com as preparações CTRL. Este padrão de atividade foi observado também por Parsons e colaboradores (2003) num modelo de diabetes induzido pela injeção de STZ na mesma espécie/tecido mas com 8 semanas de evolução (Talubmook *et al.*, 2003). Estes autores atribuíram o aumento da amplitude das contrações espontâneas ao aumento da atividade miogénica ou, por outro lado, ao aumento da atividade das células marca-passo ICC, uma vez que a atividade espontânea se manteve inalterada na presença de bloqueio muscular com atropina, e da prevenção da atividade nervosa com TTX, mas foi inibida pela nifedipina, que inibe canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo L abundantes nas fibras musculares lisas. Esta interpretação está longe de ser consensual, já que o mesmo grupo (Forrest *et al.*, 2008) demonstrou no cólon da ratazana que a frequência das contrações espontâneas era controlada preferencialmente pelas ICC mioentéricas (ICC-PM), mas que o aumento da amplitude era devido à perda ou lesão das ICC musculares (ICC-IM), devido ao seu papel hiperpolarizador (inibitório) sobre as células musculares lisas adjacentes. Esta ligação não é estranha sabendo que a atividade muscular intestinal funciona como um sincício do qual fazem parte neurónios mioentéricos, células intersticiais, células musculares entre outras (Sanders *et al.*, 2014).

Curiosamente, o plexo mioentérico do íleo dos animais diabéticos 14 dias após injeção com STZ perdeu as ICC do plano ganglionar marcadas com ANO-1 (ICC-PM), mantendo praticamente intacta a imunorreactividade das ICC-IM comparativamente com os animais CTRL (Figura 37). Este resultado reforça uma série de evidências que apontam para uma alteração da quantidade e/ou atividade das ICC em diferentes modelos animais de diabetes (Forrest *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2011, Talubmook *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2009). No que respeita à marcação neuronal, observou-se uma perda significativa dos neurónios (inibitórios) nitrérgicos marcados positivamente com nNOS nos animais diabéticos STZ (Figura 35), tanto no plano ganglionar como no plano muscular, que não foi acompanhada por alterações significativas no número de neurónios (excitatórios) colinérgicos marcados com VAcHt (Figura 36). A perda de neurónios nitrérgicos foi também observada em ratazanas STZ às 10 semanas de evolução da diabetes, sendo esta revertida pela insulinoaterapia (Anitha *et al.*, 2006, Nezami and Srinivasan, 2010, Takahashi *et al.*, 1997, Watkins *et al.*, 2000, Yarandi and Srinivasan, 2014). Quanto ao

número de neurónios colinérgicos (Figura 36), existem relatos na literatura mostrando aumentos dos neurónios marcados com a enzima responsável pela síntese de ACh, ChAT (colina acetiltransferase), noutras espécies de animais diabéticos (LePard, 2005, Spangeus *et al.*, 2000).

A perda do componente responsável pela ritmicidade, ICC-PM, nos animais diabéticos pode justificar, pelo menos em parte, a ausência de efeito do mibefradil, um bloqueador dos canais de Ca^{2+} de tipo T que são fundamentais para a atividade marca-passo das ICC. Inesperadamente o mibefradil reduziu a amplitude das contrações espontâneas tanto em tecidos CTRL como STZ (Figura 30 B). Este efeito pode dever-se ao bloqueio inespecífico de canais de Ca^{2+} de tipo L ($>3 \mu\text{M}$) existentes nas fibras musculares lisas, para além dos canais de Ca^{2+} de tipo T mais abundantes nas ICC, cuja consequência será a redução de força de contração observada nos dois grupos de animais (De Ponti *et al.*, 1989, Karam *et al.*, 1999, Leuranguer *et al.*, 2001).

O aumento da amplitude das contrações espontâneas nos animais diabéticos pode dever-se à perda da componente nitrérgica inibitória, já que a sensibilidade da musculatura lisa ileal à ACh mantém-se praticamente inalterada ou até diminuída nos animais diabéticos STZ (ver Figura 34). No entanto, esta interpretação parece ser demasiado simplista já que o bloqueio dos circuitos neuronais intrínsecos do íleo pela incubação com TTX ($1\mu\text{M}$), uma neurotoxina que inibe os canais de sódio dependentes da voltagem bloqueando a condução neuronal (Lee and Ruben, 2008), não influenciou significativamente a atividade contráctil espontânea do íleo (Figura 32), tanto em animais CTRL como em animais STZ (Coulson *et al.*, 2002, Nowak *et al.*, 1990, Talubmook *et al.*, 2003). Os resultados sugerem que o padrão de atividade espontânea do íleo observado nos animais diabéticos STZ não parece depender de alterações dos componentes neuronal e miogénico, mas pode ser atribuída a uma alteração do número das ICC-PM e/ou do funcionamento das ICC-IM e ICC-DMP.

Deficiências na inervação do trato GI devido a uma modificação nos sistemas adrenérgicos e colinérgicos têm sido descritas em animais diabéticos (Belai *et al.*, 1991, Yarandi and Srinivasan, 2014). No que respeita às alterações da resposta colinérgica nos animais diabéticos, mantêm-se em aberto todas as possibilidades a avaliar pelos dados existentes na literatura: aumento (*e.g.* Talubmook *et al.*, 2003), manutenção (*e.g.* Coulson *et al.* 2002) ou diminuição da resposta à ACh e seus análogos. A redução da resposta à ACh observada

neste trabalho carece de normalização mas pode ser devida à (1) diminuição do número de recetores muscarínicos, ou (2) a modificações das vias de transdução de sinal ou do próprio aparelho contráctil (Coulson *et al.*, 2002, Yarandi and Srinivasan, 2014, Zochodne and Malik, 2014). Um estudo de Liu e colaboradores (1988) realizado em preparações de músculo longitudinal e circular do duodeno, jejuno e íleo de animais STZ (com 4 semanas de indução) demonstrou que as curvas de concentração-resposta da ACh e da SP possuíam menor amplitude máxima (Liu *et al.*, 1988). Em ratos OLETF (modelo de DM tipo 2) foi demonstrado que a perda de resposta à ACh se devia a uma perda de recetores muscarínicos M₃ (Kim *et al.*, 2011).

Considerando que a sinalização purinérgica desempenha um papel relevante no controlo da motilidade intestinal (Shakil *et al.*, 2008, Yarandi and Srinivasan, 2014), decidimos avaliar a sua influência no íleo de animais diabéticos numa tentativa de explicar a fisiopatologia da dismotilidade diabética e, eventualmente, encontrar um ponto de intervenção terapêutica para esta condição. Estudos anteriormente realizados demonstraram que no plexo mioentérico do íleo de ratos a adenosina modula a libertação de ACh por ativação de recetores facilitatórios A_{2A} localizados nos terminais nervosos e recetores inibitórios A₁ ganglionares (Duarte-Araújo, *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2011). Curiosamente, nos animais diabéticos STZ verificou-se que o controlo inibitório sobre a libertação de ACh induzida por estimulação elétrica operado pelos recetores A₁ (efeito da R-PIA) permanecia inalterado, ao contrário do desaparecimento do efeito facilitatório mediado pelos recetores A_{2A} (efeito do CGS 21680). A predominância da atividade inibitória A₁ em detrimento da facilitação exercida pelo recetor A_{2A} da adenosina sobre a libertação de ACh pelos neurónios colinérgicos contribui para explicar a redução da motilidade GI e encontra alicerce na perda de expressão dos recetores A_{2A} verificada nas terminações nervosas colinérgicas (VACHT-positivas) dos animais diabéticos.

A adenosina pode ser libertada para o meio extracelular por intermédio de transportadores específicos de nucleósidos ou a partir do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina, nomeadamente ATP, libertados. No ML-PM do íleo da ratana, a cinética do catabolismo extracelular de ATP é regulada por uma cascata de enzimas, ectonucleotidases, que foram caracterizadas anteriormente pelo nosso grupo (Duarte-Araújo M, 2014, Gonçalves-Monteiro, 2013). Neste trabalho, mostra-se que no íleo dos animais diabéticos STZ a velocidade de metabolização extracelular do ATP é ligeiramente

mais rápida ($t_{1/2} = 4$ vs. 7 min) e a adenosina atinge concentrações máximas mais precocemente (30 vs. 10 min) que nos animais CTRL. À semelhança do grupo CTRL (Vieira *et al.*, 2014), a expressão das NTPDases 2 e 3 foi confirmada nos animais diabéticos STZ estando a primeira mais expressa a nível ganglionar e nas fibras de primeira ordem e a segunda existindo também nas fibras nervosas ao nível da junção neuromuscular. Nota-se uma ligeira tendência (a confirmar) para um aumento da intensidade de marcação da NTPDase 3 nos diabéticos, que pode justificar a diferença na velocidade da metabolização do ATP e da formação de adenosina neste grupo de animais.

O passo limitante para a formação de adenosina a partir dos nucleótidos de adenina libertados no plexo mioentérico do íleo da ratazana é a desfosforilação do AMP em adenosina catalisado pela E-5'-nucleotidase (Duarte-Araújo *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2014; revisto por Cardoso *et al.*, 2015). Neste trabalho verificou-se que a velocidade de formação de adenosina a partir do AMP (atividade da E-5'-nucleotidase) foi significativamente maior nos animais STZ do que nos CTRL. Surpreendentemente, não se observou um aumento significativo da imunoreactividade contra a E-5'-nucleotidase na camada muscular do íleo das ratazanas diabéticas comparativamente com os tecidos controlo. Este resultado antecipa um aumento da atividade intrínseca da enzima nos animais diabéticos que carece de explicação.

O aumento da atividade da E-5'-nucleotidase foi também foi relatada em cardiomiócitos de animais diabéticos (Podgorska *et al.*, 2006); estes autores mostraram que o rácio entre a atividade da E-5'-nucleotidase e da adenosina desaminase favorecia a acumulação de adenosina no meio extracelular. Esta situação não condiz com os resultados obtidos em preparações de ML-PM do íleo de ratazanas diabéticas STZ (este trabalho) porque apesar de se ter verificado um aumento da atividade da E-5'-nucleotidase não se observou um aumento significativo da acumulação de adenosina no meio extracelular em virtude do aumento da taxa do seu desaparecimento/inativação. Neste contexto, verificou-se uma perda de estequiometria acentuada em todas as cinéticas enzimáticas realizadas em animais diabéticos STZ utilizando os seguintes substratos: ATP, AMP e ADO; mas este fenómeno não foi observado quando se usou INO (30 μ M) como substrato (Figura 48). Este resultado pressupõe que a taxa de desaparecimento da ADO formada / aplicada ao meio de incubação é superior nos animais diabéticos STZ do que nos controlos, sem que isso

resulte na maior formação dos seus metabolitos (INO e HX) no meio extracelular resultantes da atividade da adenosina desaminase (ADA) (Figura 47).

No plexo mioentérico do íleo de ratas CTRL, a ADO é inativada preferencialmente por desaminação havendo, também, uma contribuição significativa do fenómeno de recaptação celular mediada por transportadores de nucleósidos sensíveis ao dipiridamol (Duarte-Araújo *et al.*, 2004, Correia-de-Sá *et al.*, 2006). Contudo, os dados apresentados neste trabalho mostram que tanto a inibição da ADA com EHNA (50 μ M) como o bloqueio do sistema de recaptação celular pelo dipiridamol (0,5 μ M), não preveniram a perda de estequiometria observada nas cinéticas de inativação da ADO (30 μ M) nos animais diabéticos STZ. É importante realçar o facto de que apenas o EHNA, mas não o dipiridamol, ter aumentado significativamente o tempo de semi-vida da ADO no meio de incubação, sugerindo que os transportadores equilibrativos de nucleósidos sensíveis ao dipiridamol perdem alguma relevância no controlo dos níveis extracelulares de ADO nos animais diabéticos STZ.

Os transportadores equilibrativos de nucleósidos caracterizam-se atendendo ao bloqueio por inibidores seletivos e pela capacidade de transportar diferentes nucleósidos naturais. O ENT1 tem maior afinidade que o ENT2 para todos os nucleósidos naturais (exceto a INO) (Baldwin *et al.*, 2004, SenGupta and Unadkat, 2004); este transportador é muito sensível ao NBTI. Já o ENT2 é menos sensível ao NBTI em roedores (Griffiths *et al.*, 1997, Yao *et al.*, 1997) e em humanos (SenGupta and Unadkat, 2004). O envolvimento de transportadores de nucleósidos insensíveis ao dipiridamol, mas sensíveis ao NBTI (30 μ M) pode estar em causa, uma vez que, embora não tenham alterado significativamente a semi-vida da ADO (30 μ M) no plexo mioentérico do íleo de ratas CTRL e STZ, parece ter diminuído parcialmente a perda de estequiometria observada em animais STZ.

Neste contexto, colocou-se a hipótese de que a ADO pudesse estar a ser incorporada pelas células do PM-ML do íleo de ratas diabéticas através de sistema de transporte concentrativo de nucleósidos (CNT) dependente do co-transporte de iões sódio, tal como foi observado em células do epitélio intestinal e renal (Gray *et al.*, 2004). De facto, a perda de estequiometria observada nas cinéticas de inativação de ADO (30 μ M) no PM-ML do íleo de animais diabéticos STZ foi prevenida pela co-aplicação de ouabaína (2 mM), um composto capaz de bloquear a Na⁺/K⁺-ATPase e, portanto, inverter o gradiente de sódio

através da membrana plasmática e a recaptação de nucleósidos através de transportadores concentrativos (Read *et al.*, 1979). O recrutamento adicional de transportadores concentrativos de nucleósidos talvez seja o principal responsável pelas diferenças observadas na cinética de inativação da ADO no plexo mioentérico de ratasanas diabéticas STZ comparativamente com o grupo CTRL. Este mecanismo parece contribuir decisivamente para o controlo dos níveis de ADO no meio extracelular resultante do catabolismo dos nucleótidos de adenina por via das ectonucleotidases, nomeadamente devido à excessiva atividade da ecto-5'-nucleotidase. Estudos anteriores demonstraram que, no coração de ratos diabéticos, se verificou um aumento significativo dos CNT1 e CNT2 (Pawelczyk *et al.*, 2003) que foi revertido após a administração de insulina.

Este estudo revela que na dismotilidade diabética, apesar do catabolismo extracelular do ATP estar exacerbado não há acumulação de adenosina. Para além deste nucleósido ser intensamente desaminado e recaptado, a perda de recetores facilitatórios A_{2A} pode condicionar a neurotransmissão colinérgica contribuindo assim para a obstipação, uma das queixas mais prevalentes dos pacientes diabéticos.

VI. CONCLUSÃO

O impacto da *Diabetes mellitus* sobre a saúde da população é hoje em dia uma preocupação de escala mundial. Com este trabalho esperamos ter contribuído para o estudo da dismotilidade diabética, uma condição que afeta cerca de três quartos dos pacientes.

O modelo animal de DM tipo 1, obtido pela administração IP de STZ com uma evolução de 14 dias, permitiu-nos obter animais com elevados valores de glicemia, sintomatologia diabética (polidipsia, poliúria e polifagia) e dismotilidade, compatível com o estudo pretendido.

Verificamos que estes animais diabéticos apresentavam um atraso na motilidade GI, justificável quer pela perda neuronal (nitrgica, não colinérgica) quer pela perda de atividade das ICC. Estas alterações foram também evidentes nos estudos de contração muscular efetuados, onde foi possível identificar uma perda da ritmicidade com aumento da amplitude das contrações espontâneas. Estas alterações de origem miogénica (insensíveis à TTX) poderão estar associadas a uma disfunção das ICC, mas serão necessários estudos adicionais para o poder afirmar.

Quanto à resposta muscular colinérgica, estudos preliminares indicam que há uma perda de sensibilidade à ACh, devida provavelmente à perda de recetores M3. Como estes recetores estão diretamente implicados na neuromodulação purinérgica mioentérica, estudamos de seguida o papel dos recetores de elevada afinidade da adenosina sobre a libertação de ACh. Constatámos que o efeito A_1 (inibitório) se mantém inalterado, mas que há uma perda do efeito facilitatório mediado por recetores A_{2A} , que parecem estar menos expressos nos terminais nervosos dos animais diabéticos.

Adicionalmente, verificamos que nestes animais o catabolismo do ATP e seus metabolitos está acelerado, levando à formação mais precoce de ADP, AMP e ADO. Contudo, a ADO não se acumula no meio extracelular, sendo ativamente desaminada em INO e recaptada. Curiosamente a recaptação de adenosina em animais diabéticos deixa de ser dependente de transportadores equilibrativos sensíveis ao dipiridamol para ser preferencialmente mediada por transportadores concentrativos sensíveis à oubaína, que recupera a estequiometria das cinéticas do desaparecimento da adenosina realizada nos animais diabéticos.

Com este trabalho experimental esperamos ter proporcionado um modelo animal adequado para o estudo da dismotilidade diabética, que pode dever-se quer à perda da atividade

nitrérgica das ICC, quer à perda da neuromodulação purinérgica mediada por recetores A_{2A} , comprometendo assim a libertação de ACh e consequentemente a motilidade GI.

VII. PRESPECTIVAS FUTURAS

Para a continuidade deste estudo considerávamos importante esclarecer/aprofundar:

- a) Qual o contributo miogénico e neurogénico (nitrérgico, colinérgico e purinérgico) para as alterações observadas na contração muscular dos animais diabéticos;
- b) A perda de recetores M_3 e A_{2A} e a sua localização;
- c) O aumento da expressão/atividade das NTPDase e E-5'-nucleotidase
- d) A perda da autofacilitação muscarínica mediada pelos recetores A_{2A} nos animais diabéticos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., BOEYNAEMS, J. M., BARNARD, E. A., BOYER, J. L., KENNEDY, C., KNIGHT, G. E., FUMAGALLI, M., GACHET, C., JACOBSON, K. A. & WEISMAN, G. A. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, 58, 281-341.
- ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A. & ZIMMERMANN, H. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32, 19-29.
- AKBARZADEH, A., NOROUZIAN, D., MEHRABI, M. R., JAMSHIDI, S., FARHANGI, A., VERDI, A. A., MOFIDIAN, S. M. A. & RAD, B. L. 2007. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22, 60-64.
- AL-SHBOUL, O. A. 2013. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi J Gastroenterol*, 19, 3-15.
- AMBACHE, N. 1954. Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet. *J Physiol*, 125, 53-5P.
- ANITHA, M., GONDHA, C., SUTLIFF, R., PARSADANIAN, A., MWANGI, S., SITARAMAN, S. V. & SRINIVASAN, S. 2006. GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest*, 116, 344-56.
- ANTONIOLI, L., COLUCCI, R., PELLEGRINI, C., GIUSTARINI, G., TUCCORI, M., BLANDIZZI, C. & FORNAI, M. 2013. The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: pharmacological modulation and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther*, 139, 157-88.
- ANTONIOLI, L., FORNAI, M., COLUCCI, R., GHISU, N., TUCCORI, M., DEL TACCA, M. & BLANDIZZI, C. 2008. Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacol Ther*, 120, 233-53.
- ASSOCIATION, A. D. 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care*, 27 (1), 5-10.
- ASSOCIATION, A. D. 2007. Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 30 (1), 42-47.
- ASSOCIATION, A. D. 2015. Classification and Diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 1, 8-16.
- BAGYANSZKI, M. & BODI, N. 2012. Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World J Diabetes*, 3, 80-93.
- BAGYÁNSZKI, M. & BÓDI, N. 2012. Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World Journal of Diabetes*, 3, 80-93.
- BALDWIN, S. A., BEAL, P. R., YAO, S. Y., KING, A. E., CASS, C. E. & YOUNG, J. D. 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, 447, 735-43.
- BAQI, Y., WEYLER, S., IQBAL, J., ZIMMERMANN, H. & MULLER, C. E. 2009. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). *Purinergic Signal*, 5, 91-106.
- BAROJA-MAZO, A., BARBERA-CREMADES, M. & PELEGRIN, P. 2013. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 79-93.
- BELAI, A., LEFEBVRE, R. A. & BURNSTOCK, G. 1991. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 194, 225-34.
- BELAI, A., LINCOLN, J. & BURNSTOCK, G. 1987. Lack of release of vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptide during electrical stimulation of enteric nerves in streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology*, 93, 1034-40.
- BELAI, A., LINCOLN, J., MILNER, P. & BURNSTOCK, G. 1988. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology*, 95, 1234-41.
- BELCHER, S. M., ZSARNOVSZKY, A., CRAWFORD, P. A., HEMANI, H., SPURLING, L. & KIRLEY, T. L. 2006. Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience*, 137, 1331-46.
- BENNETT, R. A. & PEGG, A. E. 1981. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res*, 41, 2786-90.

- BIGONNESSE, F., LEVESQUE, S. A., KUKULSKI, F., LECKA, J., ROBSON, S. C., FERNANDES, M. J. & SEVIGNY, J. 2004. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, 43, 5511-9.
- BOGERS, J., MOREELS, T., DE MAN, J., VROLIX, G., JACOBS, W., PELCKMANS, P. & VAN MARCK, E. 2000. Schistosoma mansoni infection causing diffuse enteric inflammation and damage of the enteric nervous system in the mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil*, 12, 431-40.
- BORNSTEIN, J. C. 2008. Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic Signal*, 4, 197-212.
- BOURS, M. J., SWENNEN, E. L., DI VIRGILIO, F., CRONSTEIN, B. N. & DAGNELIE, P. C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112, 358-404.
- BOZAROV, A., WANG, Y. Z., YU, J. G., WUNDERLICH, J., HASSANAIN, H. H., ALHAJ, M., COOKE, H. J., GRANTS, I., REN, T. & CHRISTOFI, F. L. 2009. Activation of adenosine low-affinity A3 receptors inhibits the enteric short interplexus neural circuit triggered by histamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297, G1147-62.
- BROOKES, S. J. 2001. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec*, 262, 58-70.
- BROOKES, S. J., COSTA, M. 2006. *Functional Histoanatomy of the Enteric Nervous System*, Physiology of the Gastrointestinal Tract.
- BURNSTOCK, G. 1976. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62, 491-503.
- BURNSTOCK, G. 2003. *Purinergic receptors in the nervous system*. In *Current Topics in Membranes*.
- BURNSTOCK, G. 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 166-76.
- BURNSTOCK, G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, 87, 659-797.
- BURNSTOCK, G. 2008. Purinergic receptors as future targets for treatment of functional GI disorders. *Gut*, 57, 1193-4.
- BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D. & SMYTHE, A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*, 40, 668-88.
- BURNSTOCK, G. & NOVAK, I. 2013. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal*, 9, 307-24.
- BZOWSKA, A., KULIKOWSKAA, E., SHUGARA, D. 2000. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 88, P349-P425.
- CANO-SOLDADO, P. & PASTOR-ANGLADA, M. 2012. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev*, 32, 428-57.
- CARDOSO, A. M., SCHETINGER, M. R., CORREIA-DE-SA, P. & SEVIGNY, J. 2015. Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci*, 191, 25-38.
- CARUSO-NEVES, C., FRANCISCO-PEDRO, L. G., SOUZA, L. P., CHAGAS, C. & LOPES, A. G. 1997. Effect of adenosine on the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta*, 1329, 336-44.
- CASCALHEIRA, J. F. & SEBASTIAO, A. M. 1992. Adenine nucleotide analogues, including gamma-phosphate-substituted analogues, are metabolised extracellularly in innervated frog sartorius muscle. *Eur J Pharmacol*, 222, 49-59.
- CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MORAES, M. C., OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. 2009. Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. *Bioanalysis*, 1, 577-94.
- CHALAZONITIS, A., TANG, A. A., SHANG, Y., PHAM, T. D., HSIEH, I., SETLIK, W., GERSHON, M. D. & HUANG, E. J. 2011. Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates postnatal development of enteric dopaminergic neurons and glia via BMP signaling. *J Neurosci*, 31, 13746-57.
- CHANDRASEKHARAN, B. & SRINIVASAN, S. 2007. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 19, 951-60.
- CHAUDHRY, Z. Z., MORRIS, D. L., MOSS, D. R., SIMS, E. K., CHIONG, Y., KONO, T. & EVANS-MOLINA, C. 2013. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim*, 47, 257-65.
- CHRISTOFI, F. L. 2008. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal*, 4, 213-36.

- CIRUELA, F., ALBERGARIA, C., SORIANO, A., CUFFI, L., CARBONELL, L., SANCHEZ, S., GANDIA, J. & FERNANDEZ-DUENAS, V. 2010. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 9-20.
- COOKE, H. J., WUNDERLICH, J. & CHRISTOFI, F. L. 2003. "The force be with you": ATP in gut mechanosensory transduction. *News Physiol Sci*, 18, 43-9.
- CORREIA-DE-SA, P., ADAES, S., TIMOTEO, M. A., VIEIRA, C., MAGALHAES-CARDOSO, T., NASCIMENTO, C. & DUARTE-ARAUJO, M. 2006. Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: on the role of secreted adenosine deaminase. *Auton Neurosci*, 126-127, 211-24.
- COSTA, M., BROOKES, S. J. & HENNIG, G. W. 2000. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4, iv15-9; discussion iv26.
- COSTA, M., BROOKES, S. J., STEELE, P. A., GIBBINS, I., BURCHER, E. & KANDIAH, C. J. 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, 75, 949-67.
- COULSON, F. R., JACOBY, D. B. & FRYER, A. D. 2002. Increased function of inhibitory neuronal M2 muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 135, 1355-62.
- CRONSTEIN, B. N. 1995. A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: adenosine release at inflamed sites. *J Investig Med*, 43, 50-7.
- DE PONTI, F., D'ANGELO, L., FRIGO, G. M. & CREMA, A. 1989. Inhibitory effects of calcium channel blockers on intestinal motility in the dog. *Eur J Pharmacol*, 168, 133-44.
- DEEDS, M. C., ANDERSON, J. M., ARMSTRONG, A. S., GASTINEAU, D. A., HIDDINGA, H. J., JAHANGIR, A., EBERHARDT, N. L. & KUDVA, Y. C. 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*, 45, 131-40.
- DEMEDTS, I., MASAOKA, T., KINDT, S., DE HERTOOGH, G., GEBOES, K., FARRE, R., VANDEN BERGHE, P. & TACK, J. 2013. Gastrointestinal motility changes and myenteric plexus alterations in spontaneously diabetic biobreeding rats. *J Neurogastroenterol Motil*, 19, 161-70.
- DIABETES, R. D. O. N. D. 2014. Diabetes Factos e Números, Portugal 2014. In: DIABETOLOGIA, S. P. D. (ed.).
- DUARTE, J. M., OLIVEIRA, C. R., AMBROSIO, A. F. & CUNHA, R. A. 2006. Modification of adenosine A1 and A2A receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int*, 48, 144-50.
- DUARTE, J. M., OSES, J. P., RODRIGUES, R. J. & CUNHA, R. A. 2007. Modification of purinergic signaling in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*, 149, 382-91.
- DUARTE-ARAUJO M, G.-M. S., TAVARES C, MAGALHÃES-CARDOSO MT, FERREIRINHA MF, SEVIGNY J, CORREIA-DE-SÁ P 2014. The topology and enzymatic activity of distinct E-NTPDases as fine-tuning regulators of purinergic signaling in the rat ileum. *Abstracts from Purines 2014, an International Conference on Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases, held in Bonn, Germany, from July 23–27, Elsevier; 2014*.
- DUARTE-ARAUJO, M., NASCIMENTO, C., ALEXANDRINA TIMOTEO, M., MAGALHAES-CARDOSO, T. & CORREIA-DE-SA, P. 2004. Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A(2A) and extrajunctional inhibitory A(1) receptors. *Br J Pharmacol*, 141, 925-34.
- DUARTE-ARAUJO, M., NASCIMENTO, C., TIMOTEO, M. A., MAGALHAES-CARDOSO, M. T. & CORREIA-DE-SA, P. 2009. Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acetylcholine release from myenteric motoneurons. *Br J Pharmacol*, 156, 519-33.
- DUNN, P. M., ZHONG, Y. & BURNSTOCK, G. 2001. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*, 65, 107-34.
- EBERT, E. C. 2005. Gastrointestinal complications of *Diabetes mellitus*. *Dis Mon*, 51, 620-63.
- EDWARDS, F. A., GIBB, A. J. & COLQUHOUN, D. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, 359, 144-7.
- EISENBARTH, G. S. 2004. *Type 1 Diabetes: Molecular, Cellular and Clinical Immunology*, Springer US.
- EPPELSON, A., HATTON, W. J., CALLAGHAN, B., DOHERTY, P., WALKER, R. L., SANDERS, K. M., WARD, S. M. & HOROWITZ, B. 2000. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C529-39.
- ERION, M. D., NIWAS, S., ROSE, J. D., ANANTHAN, S., ALLEN, M., SECRIST, J. A., 3RD, BABU, Y. S., BUGG, C. E., GUIDA, W. C., EALICK, S. E. & ET AL. 1993. Structure-based design of

- inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. 3. 9-Arylmethyl derivatives of 9-deazaguanine substituted on the methylene group. *J Med Chem*, 36, 3771-83.
- EVANS, R. J., DERKACH, V. & SURPRENANT, A. 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*, 357, 503-5.
- FELDMAN, M. & SCHILLER, L. R. 1983. Disorders of gastrointestinal motility associated with *Diabetes mellitus*. *Ann Intern Med*, 98, 378-84.
- FERNLEY, H. N. & WALKER, P. G. 1967. Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem J*, 104, 1011-8.
- FERREIRA, P. E. B., LOPES, C. R. P., ALVES, A. M. P., ALVES, É. P. B., LINDEN, D. R., ZANONI, J. N. & BUTTOW, N. C. 2013. Diabetic neuropathy: An evaluation of the use of quercetin in the cecum of rats. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 19, 6416-6426.
- FORREST, A., HUIZINGA, J. D., WANG, X. Y., LIU, L. W. & PARSONS, M. 2008. Increase in stretch-induced rhythmic motor activity in the diabetic rat colon is associated with loss of ICC of the submuscular plexus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. United States.
- FOX, A., EASTWOOD, C., GENTRY, C., MANNING, D. & URBAN, L. 1999. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain*, 81, 307-16.
- FREDHOLM, B. B., AP, I. J., JACOBSON, K. A., KLOTZ, K. N. & LINDEN, J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53, 527-52.
- FREDHOLM, B. B., ARSLAN, G., HALLDNER, L., KULL, B., SCHULTE, G. & WASSERMAN, W. 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 362, 364-74.
- FURNESS, J. B. 2006. *The enteric nervous system*. Blackwell Publishing.
- FURNESS, J. B. 2008. *The Enteric Nervous System*. Wiley.
- GATOPOULOU, A., PAPANAS, N. & MALTEZOS, E. 2012. Diabetic gastrointestinal autonomic neuropathy: current status and new achievements for everyday clinical practice. *Eur J Intern Med*, 23, 499-505.
- GAZIA MMA, H. N. 2012. Effect of Glabridin on the Structure of Ileum and Pancreas in Diabetic Rats: A histological, Immunohistochemical and Ultrastructural Study *Nature and Science*, 10, 78-90.
- GENDRON, F. P., BENREZZAK, O., KRUGH, B. W., KONG, Q., WEISMAN, G. A. & BEAUDOIN, A. R. 2002. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets*, 3, 229-45.
- GERSHON, M. D. 1999. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (1995)*, 34, 31-2, 35-8, 41-2 passim.
- GEVER, J. R., COCKAYNE, D. A., DILLON, M. P., BURNSTOCK, G. & FORD, A. P. 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch*, 452, 513-37.
- GIARONI, C., DE PONTI, F., COSENTINO, M., LECCHINI, S. & FRIGO, G. 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology*, 117, 1438-58.
- GIARRATANA, N., PENNA, G. & ADORINI, L. 2007. Animal models of spontaneous autoimmune disease: type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Methods Mol Biol*, 380, 285-311.
- GIORDANA, B., REPETTO, F. & BIANCHI, A. 1973. Ouabain action on sodium, chloride and fluid transport in rabbit jejunum and ileum. *Experientia*, 29, 1243-4.
- GOMEZ-PINILLA, P. J., GIBBONS, S. J., BARDSLEY, M. R., LORINCZ, A., POZO, M. J., PASRICHA, P. J., VAN DE RIJN, M., WEST, R. B., SARR, M. G., KENDRICK, M. L., CIMA, R. R., DOZOIS, E. J., LARSON, D. W., ORDOG, T. & FARRUGIA, G. 2009. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1370-81.
- GONÇALVES-MONTEIRO. 2013. *Expressão, localização e atividade das ecto-nucleotidases no intestino de ratão*. Licenciatura, ICBAS-UP.
- GOVINDARAJAN, R., BAKKEN, A. H., HUDKINS, K. L., LAI, Y., CASADO, F. J., PASTOR-ANGLADA, M., TSE, C. M., HAYASHI, J. & UNADKAT, J. D. 2007. In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1809-22.
- GRAY, J. H., OWEN, R. P. & GIACOMINI, K. M. 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, 447, 728-34.

- GRIFFITHS, M., YAO, S. Y., ABIDI, F., PHILLIPS, S. E., CASS, C. E., YOUNG, J. D. & BALDWIN, S. A. 1997. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J*, 328 (Pt 3), 739-43.
- GWYNNE, R. M. & BORNSTEIN, J. C. 2007. Synaptic transmission at functionally identified synapses in the enteric nervous system: roles for both ionotropic and metabotropic receptors. *Curr Neuroparmacol*, 5, 1-17.
- HANANI, M., FARRUGIA, G. & KOMURO, T. 2005. Intercellular coupling of interstitial cells of cajal in the digestive tract. *Int Rev Cytol*, 242, 249-82.
- HARRINGTON, A. M., HUTSON, J. M. & SOUTHWELL, B. R. 2010. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem*, 44, 173-202.
- HISANO, N. 2007. Intestinal Auerbach plexus structures with NADH histochemistry in three strains of spontaneous diabetic rats. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 37, 91-8.
- HORIGUCHI, K., SANDERS, K. M. & WARD, S. M. 2003. Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tissue Res*, 311, 299-313.
- HOROWITZ, M. & SAMSOM, M. 2004. *Gastrointestinal Function in Diabetes mellitus*, Wiley.
- HUIZINGA, J. D., THUNEBERG, L., KLUPPEL, M., MALYSZ, J., MIKKELSEN, H. B. & BERNSTEIN, A. 1995. W/kir gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, 373, 347-9.
- ISMAIL ZB, A. K., ABU-HALAWEH SA, AL-ESSA MK, ABUABEELEH J, ALSMADY MM. 2009. Induction of *Diabetes mellitus* in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison between 2 Strains of Rats *European Journal of Scientific Research*, 32, 398-402.
- JACOBSON, K. A. 2009. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol*, 1-24.
- JACOBSON, K. A. & GAO, Z. G. 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 247-64.
- JARVIS, M. F. & KHAKH, B. S. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, 56, 208-15.
- JOOST HG, A.-H. H., SCHÜRMANN A. 2012. *Animal Models in Diabetes Research*, London, Human Press.
- KARAM, H., CLOZEL, J. P., BRUNEVAL, P., GONZALEZ, M. F. & MENARD, J. 1999. Contrasting effects of selective T- and L-type calcium channel blockade on glomerular damage in DOCA hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 673-8.
- KARUNANAYAKE, E. H., BAKER, J. R., CHRISTIAN, R. A., HEARSE, D. J. & MELLOWS, G. 1976. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14C) - streptozotocin in the rat. *Diabetologia*, 12, 123-8.
- KAZMERS, I. S., MITCHELL, B. S., DADONNA, P. E., WOTRING, L. L., TOWNSEND, L. B. & KELLEY, W. N. 1981. Inhibition of purine nucleoside phosphorylase by 8-aminoguanosine: selective toxicity for T lymphoblasts. *Science*, 214, 1137-9.
- KIM, S. J., PARK, J. H., SONG, D. K., PARK, K. S., LEE, J. E., KIM, E. S., CHO, K. B., JANG, B. K., CHUNG, W. J., HWANG, J. S., KWON, J. G. & KIM, T. W. 2011. Alterations of colonic contractility in long-term diabetic rat model. *J Neurogastroenterol Motil*, 17, 372-80.
- KING, A. E., ACKLEY, M. A., CASS, C. E., YOUNG, J. D. & BALDWIN, S. A. 2006. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 416-25.
- KING, A. J. 2012. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166, 877-94.
- KLOTZ, K. N. 2000. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 362, 382-91.
- KNOWLES, A. F. & LI, C. 2006. Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. *Biochemistry*, 45, 7323-33.
- KOLACHALA, V. L., BAJAJ, R., CHALASANI, M. & SITARAMAN, S. V. 2008. Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G401-10.
- KONG, W., ENGEL, K. & WANG, J. 2004. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab*, 5, 63-84.
- KONRAD, R. J. & KUDLOW, J. E. 2002. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med*, 10, 535-9.
- KUKULSKI, F., LEVESQUE, S. A., LAVOIE, E. G., LECKA, J., BIGONNESSE, F., KNOWLES, A. F., ROBSON, S. C., KIRLEY, T. L. & SEVIGNY, J. 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*, 1, 193-204.

- LANG, F. 2009. *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease: With 213 Tables*, Springer.
- LAZAROWSKI, E. R., BOUCHER, R. C. & HARDEN, T. K. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*, 64, 785-95.
- LEDoux, S. P., WOODLEY, S. E., PATTON, N. J. & WILSON, G. L. 1986. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes*, 35, 866-72.
- LEE, C. H. & RUBEN, P. C. 2008. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)*, 2, 407-12.
- LEES-GREEN, R., DU, P., O'GRADY, G., BEYDER, A., FARRUGIA, G. & PULLAN, A. J. 2011. Biophysically based modeling of the interstitial cells of cajal: current status and future perspectives. *Front Physiol*, 2, 29.
- LENZEN, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51, 216-26.
- LEPARD, K. J. 2005. Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea pig. *Auton Neurosci*, 118, 12-24.
- LEURANGUER, V., MANGONI, M. E., NARGEOT, J. & RICHARD, S. 2001. Inhibition of T-type and L-type calcium channels by mibefradil: physiologic and pharmacologic bases of cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol*, 37, 649-61.
- LEVESQUE, S. A., LAVOIE, E. G., LECKA, J., BIGONNESSE, F. & SEVIGNY, J. 2007. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol*, 152, 141-50.
- LI, Y., KOJIMA, H., FUJINO, K., MATSUMURA, K., KATAGI, M., URABE, H., CHAN, L., EGUCHI, Y., ZHAO, L. & KIMURA, H. 2011. Homing of the bone marrow-derived interstitial cells of Cajal is decreased in diabetic mouse intestine. *J Gastroenterol Hepatol*, 26, 1072-8.
- LIU, H. S., KARAKIDA, T. & HOMMA, S. 1988. Acetylcholine and substance P responsiveness of intestinal smooth muscles in streptozotocin diabetic rats. *Jpn J Physiol*, 38, 787-97.
- LIU, J., TU, H., ZHENG, H., ZHANG, L., TRAN, T. P., MUELLEMAN, R. L. & LI, Y. L. 2012. Alterations of calcium channels and cell excitability in intracardiac ganglion neurons from type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302, C1119-27.
- MAGALHAES-CARDOSO, M. T., PEREIRA, M. F., OLIVEIRA, L., RIBEIRO, J. A., CUNHA, R. A. & CORREIA-DE-SA, P. 2003. Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A2A receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve endings. *J Physiol*, 549, 399-408.
- MARQUARDT, D. L., GRUBER, H. E. & WASSERMAN, S. I. 1984. Adenosine release from stimulated mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6192-6.
- MARTINEZ-CUESTA, M. A., MASSUDA, H., WHITTLE, B. J. & MONCADA, S. 1995. Impairment of nitergic-mediated relaxation of rat isolated duodenum by experimental diabetes. *Br J Pharmacol*, 114, 919-24.
- MATSUOKA, I. & OHKUBO, S. 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci*, 94, 95-9.
- MENDES, C. E., PALOMBIT, K., VIEIRA, C., SILVA, I., CORREIA-DE-SA, P. & CASTELUCCI, P. 2015. The Effect of Ischemia and Reperfusion on Enteric Glial Cells and Contractile Activity in the Ileum. *Dig Dis Sci*, 60, 2677-89.
- MENDES-HENRIQUES, V. 2015. *Caraterização morfológica e funcional do ileo num modelo animal de diabetes tipo 1*. Licenciatura, ICBAS-UP.
- MONTGOMERY, J. A. 1993. Purine nucleoside phosphorylase: a target for drug design. *Med Res Rev*, 13, 209-28.
- MORRISON, P. D., MACKINNON, M. W., BARTRUP, J. T., SKETT, P. G. & STONE, T. W. 1992. Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol*, 105, 1004-8.
- MULLER, C. E., IQBAL, J., BAQI, Y., ZIMMERMANN, H., ROLLICH, A. & STEPHAN, H. 2006. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 5943-7.
- MURATA, M., TAKAHASHI, A., SAITO, I. & KAWANISHI, S. 1999. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol*, 57, 881-7.
- NAITO, Y. & LOWENSTEIN, J. M. 1985. 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Inhibition by adenine nucleotides and related compounds. *Biochem J*, 226, 645-51.

- NEZAMI, B. G. & SRINIVASAN, S. 2010. Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep*, 12, 358-65.
- NITAHARA, K., KITTEL, A., LIANG, S. D. & VIZI, E. S. 1995. A1-receptor-mediated effect of adenosine on the release of acetylcholine from the myenteric plexus: role and localization of ecto-ATPase and 5'-nucleotidase. *Neuroscience*, 67, 159-68.
- NOJI, T., KARASAWA, A. & KUSAKA, H. 2004. Adenosine uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol*, 495, 1-16.
- NOVIKOVA L, S. I., RAWAL S, DOTSON AL, BENEDICT SH, STEHNO-BITTEL L. 2013. Variations in Rodent Models of Type 1 Diabetes: Islet Morphology. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 13.
- NOWAK, T. V., HARRINGTON, B. & KALBFLEISCH, J. 1990. Adaptation of cholinergic enteric neuromuscular transmission in diabetic rat small intestine. *Diabetes*, 39, 891-7.
- OGURA, T., SZEKENYI, S. A., KROSNOWSKI, K., SATHYANESAN, A., JACKSON, J. & LIN, W. 2011. Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *J Neurophysiol*, 106, 1274-87.
- ORDOG, T. 2008. Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. *Neurogastroenterol Motil*, 20, 8-18.
- PATON, W. D. & VIZI, E. S. 1969. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol*, 35, 10-28.
- PATON, W. D. & ZAR, M. A. 1968. The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J Physiol*, 194, 13-33.
- PAWELCZYK, T., PODGORSKA, M. & SAKOWICZ, M. 2003. The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol Pharmacol*, 63, 81-8.
- PIEPER, A. A., VERMA, A., ZHANG, J. & SNYDER, S. H. 1999. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 171-81.
- PODGORSKA, M., KOCHBUCH, K., GRDEN, M., SZUTOWICZ, A. & PAWELCZYK, T. 2006. Prevalence of unidirectional Na⁺-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*, 101, 214-22.
- PODGORSKA, M., KOCHBUCH, K., PAWELCZYK, T. 2006. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochimica Polonica*, 52, P749-P758.
- RAKIETEN, N., RAKIETEN, M. L. & NADKARNI, M. V. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*, 29, 91-8.
- RAMOS-VARA, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405-26.
- RAMOS-VARA, J. A., KIUPEL, M., BASZLER, T., BLIVEN, L., BRODERSEN, B., CHELACK, B., CZUB, S., DEL PIERO, F., DIAL, S., EHRHART, E. J., GRAHAM, T., MANNING, L., PAULSEN, D., VALLI, V. E., WEST, K. & AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS SUBCOMMITTEE ON STANDARDIZATION OF, I. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*, 20, 393-413.
- RAYNER, C. K. & HOROWITZ, M. 2006. Gastrointestinal motility and glycemic control in diabetes: the chicken and the egg revisited? *Journal of Clinical Investigation*, 116, 299-302.
- RAYNER, C. K., SAMSOM, M., JONES, K. L. & HOROWITZ, M. 2001. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care*, 24, 371-81.
- READ, N. W., KREJS, G. J., JONES, V. E. & FORDTRAN, J. S. 1979. Effect of ouabain on Na,K-ATPase and electrolyte transport in the dog ileum in vivo. *Gut*, 20, 356-65.
- REES, D. A. & ALCOLADO, J. C. 2005. Animal models of *Diabetes mellitus*. *Diabet Med*. England.
- REN, J. & BERTRAND, P. P. 2008. Purinergic receptors and synaptic transmission in enteric neurons. *Purinergic Signal*, 4, 255-66.
- RERUP, C. C. 1970. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*, 22, 485-518.
- ROBSON, S. C., SEVIGNY, J. & ZIMMERMANN, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2, 409-30.
- ROSE, J. B. & COE, I. R. 2008. Physiology of nucleoside transporters: back to the future. *Physiology (Bethesda)*, 23, 41-8.
- SANDERS, K. M., KOH, S. D. & WARD, S. M. 2006. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*, 68, 307-43.

- SANDERS, K. M., WARD, S. M. & KOH, S. D. 2014. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol Rev*, 94, 859-907.
- SANDERS, K. M., ZHU, M. H., BRITTON, F., KOH, S. D. & WARD, S. M. 2012. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability. *Exp Physiol*, 97, 200-6.
- SANDLER, S. & SWENNE, I. 1983. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*, 25, 444-7.
- SCARPELLO, J. H., GREAVES, M. & SLADEN, G. E. 1976. Small intestinal transit in diabetics. *British Medical Journal*, 2, 1225-1226.
- SCHEIN, P. S., O'CONNELL, M. J., BLOM, J., HUBBARD, S., MAGRATH, I. T., BERGEVIN, P., WIERNIK, P. H., ZIEGLER, J. L. & DEVITA, V. T. 1974. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998). *Cancer*, 34, 993-1000.
- SENGUPTA, D. J. & UNADKAT, J. D. 2004. Glycine 154 of the equilibrative nucleoside transporter, hENT1, is important for nucleoside transport and for conferring sensitivity to the inhibitors nitrobenzylthioinosine, dipyridamole, and dilazep. *Biochem Pharmacol*, 67, 453-8.
- SHAKIL, A., CHURCH, R. J. & RAO, S. S. 2008. Gastrointestinal complications of diabetes. *Am Fam Physician*, 77, 1697-702.
- SHARGEL, L. Y., A.B.C., 1980. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. *Appleton- Century*.
- SILINSKY, E. M., GERZANICH, V. & VANNER, S. M. 1992. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol*, 106, 762-3.
- SILVA I, M. P., VIEIRA C, FERREIRINHA MF, MAGALHÃES-CARDOSO MT, DUARTE-ARAÚJO M, CORREIA-DE-SÁ P 2011. Amplification of cholinergic neurotransmission by adenosine released from Interstitial Cells of Cajal at a tripartite myenteric synapse of the rat ileum. . *Basic and Clinical*, 163, P64-P65.
- SITKOVSKY, M. V. & OHTA, A. 2005. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol*, 26, 299-304.
- SKOVSO, S. 2014. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig*, 5, 349-58.
- SOLTESOVA D, H. I. 2011. On of the Mechanisms of Diabetogenic Effects of Alloxan and Streptozotocin. 14, P130-P138.
- SPANGEUS, A., SUHR, O. & EL-SALHY, M. 2000. Diabetic state affects the innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes. *Histol Histopathol*, 15, 739-44.
- SPERLAGH, B. & VIZI, E. S. 2007. Extracellular interconversion of nucleotides reveals an ecto-adenylate kinase activity in the rat hippocampus. *Neurochem Res*, 32, 1978-89.
- STENKAMP-STRAHM, C. M., KAPPMAYER, A. J., SCHMALZ, J. T., GERICKE, M. & BALEMBA, O. 2013. High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. *Cell Tissue Res*, 354, 381-94.
- STOLZENBACH, F. 1986. Lactic dehydrogenase (crystalline). *Methods in Enzymology*, 9, P278-P288.
- SZENTPALI, K., KASZAKI, J., TISZLAVICZ, L., LAZAR, G., BALOGH, A. & BOROS, M. 2001. Bile-induced adenosine triphosphate depletion and mucosal damage during reflux esophagitis. *Scand J Gastroenterol*, 36, 459-66.
- SZKUDELSKI, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50, 537-46.
- TAKAHASHI, T., NAKAMURA, K., ITOH, H., SIMA, A. A. & OWYANG, C. 1997. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. *Gastroenterology*, 113, 1535-44.
- TALUBMOOK, C., FORREST, A. & PARSONS, M. 2003. Streptozotocin-induced diabetes modulates presynaptic and postsynaptic function in the rat ileum. *Eur J Pharmacol*, 469, 153-8.
- TESCH, G. H. & ALLEN, T. J. 2007. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 12, 261-6.
- TJALVE, H., WILANDER, E. & JOHANSSON, E. B. 1976. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*, 69, 455-6.
- TOBIN, G., GIGLIO, D. & LUNDGREN, O. 2009. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol*, 60, 3-21.
- UCHIGATA, Y., YAMAMOTO, H., KAWAMURA, A. & OKAMOTO, H. 1982. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*, 257, 6084-8.

- VAN BELLE, T. L., COPPIETERS, K. T. & VON HERRATH, M. G. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, 91, 79-118.
- VAN CALKER, D., MULLER, M. & HAMPRECHT, B. 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, 33, 999-1005.
- VIEIRA, C., DUARTE-ARAUJO, M., ADAES, S., MAGALHAES-CARDOSO, T. & CORREIA-DE-SA, P. 2009. Muscarinic M(3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 1118-e95.
- VIEIRA, C., FERREIRINHA, F., SILVA, I., DUARTE-ARAUJO, M. & CORREIA-DE-SA, P. 2011. Localization and function of adenosine receptor subtypes at the longitudinal muscle--myenteric plexus of the rat ileum. *Neurochem Int*, 59, 1043-55.
- VIEIRA, C., MAGALHAES-CARDOSO, M. T., FERREIRINHA, F., SILVA, I., DIAS, A. S., PELLETIER, J., SEVIGNY, J. & CORREIA-DE-SA, P. 2014. Feed-forward inhibition of CD73 and upregulation of adenosine deaminase contribute to the loss of adenosine neuromodulation in postinflammatory ileitis. *Mediators Inflamm*, 2014, 254640.
- WALL, M. J., WIGMORE, G., LOPATAR, J., FRENGUELLI, B. G. & DALE, N. 2008. The novel NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate (POM-1) inhibits ATP breakdown but also blocks central synaptic transmission, an action independent of NTPDase inhibition. *Neuropharmacology*, 55, 1251-8.
- WANG, X. Y., HUIZINGA, J. D., DIAMOND, J. & LIU, L. W. 2009. Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 1095-e92.
- WANG, Z. Y., HAN, Y. F., HUANG, X., LU, H. L., GUO, X., KIM, Y. C. & XU, W. X. 2010. Actin microfilament involved in regulation of pacemaking activity in cultured interstitial cells of Cajal from murine intestine. *J Membr Biol*, 234, 217-25.
- WARD, S. M., ORDOG, T., BAYGUINOV, J. R., HOROWITZ, B., EPPERSON, A., SHEN, L., WESTPHAL, H. & SANDERS, K. M. 1999. Development of interstitial cells of Cajal and pacemaking in mice lacking enteric nerves. *Gastroenterology*, 117, 584-94.
- WARD, S. M., ORDOG, T., KOH, S. D., BAKER, S. A., JUN, J. Y., AMBERG, G., MONAGHAN, K. & SANDERS, K. M. 2000. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*, 525 Pt 2, 355-61.
- WATKINS, C. C., SAWA, A., JAFFREY, S., BLACKSHAW, S., BARROW, R. K., SNYDER, S. H. & FERRIS, C. D. 2000. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *J Clin Invest*, 106, 373-84.
- WEBB, T. E., SIMON, J., KRISHEK, B. J., BATESON, A. N., SMART, T. G., KING, B. F., BURNSTOCK, G. & BARNARD, E. A. 1993. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett*, 324, 219-25.
- WEISS, R. B. 1982. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*, 66, 427-38.
- WHITE, F. R. 1963. Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep*, 30, 49-53.
- WILSON, G. L., HARTIG, P. C., PATTON, N. J. & LEDOUX, S. P. 1988. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*, 37, 213-6.
- WOODSON, J. C., MINOR, T. R. & JOB, R. F. 1998. Inhibition of adenosine deaminase by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) mimics the effect of inescapable shock on escape learning in rats. *Behav Neurosci*, 112, 399-409.
- XIANG, Z. & BURNSTOCK, G. 2004. P2X2 and P2X3 purinoceptors in the rat enteric nervous system. *Histochem Cell Biol*, 121, 169-79.
- XU, W. D., JIANG, X., LAN, L., WANG, C. H., TONG, H. X. & WANG, B. X. 2012. Long-term culture and cryopreservation of interstitial cells of Cajal. *Scand J Gastroenterol*, 47, 89-98.
- YAMAMOTO, H., UCHIGATA, Y. & OKAMOTO, H. 1981. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294, 284-6.
- YAMAMOTO, M. 1977. Electron microscopic studies on the innervation of the smooth muscle and the interstitial cell of Cajal in the small intestine of the mouse and bat. *Arch Histol Jpn*, 40, 171-201.
- YAO, S. Y., NG, A. M., MUZYKA, W. R., GRIFFITHS, M., CASS, C. E., BALDWIN, S. A. & YOUNG, J. D. 1997. Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-

- sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem*, 272, 28423-30.
- YARANDI, S. S. & SRINIVASAN, S. 2014. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil*, 26, 611-24.
- YEGUTKIN, G. G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 673-94.
- ZANONI, J. N. & HERMES-ULIANA, C. 2015. Combination vitamin C and vitamin E prevents enteric diabetic neuropathy in the small intestine in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 504-511.
- ZHU, M. H., KIM, T. W., RO, S., YAN, W., WARD, S. M., KOH, S. D. & SANDERS, K. M. 2009. A Ca(2+)-activated Cl(-) conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol*, 587, 4905-18.
- ZIMMERMANN, H. 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 49, 589-618.
- ZIMMERMANN, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 362, 299-309.
- ZIMMERMANN, H. 2001. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, 52, P45-P46.
- ZOCHODNE, D. W. & MALIK, R. A. 2014. *Diabetes and the Nervous System: Handbook of Clinical Neurology* (Series Editors: Aminoff, Boller and Swaab), Elsevier Science.